

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

**RELAÇÃO ENTRE OS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS
HISTOLÓGICOS E A EXPRESSÃO IMUNO-
HISTOQUÍMICA DA P53 NO CARCINOMA
PROSTÁTICO**

GUILHERME PORTELA COELHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, RS
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

**RELAÇÃO ENTRE OS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS
HISTOLÓGICOS E A EXPRESSÃO IMUNO-
HISTOQUÍMICA DA P53 NO CARCINOMA
PROSTÁTICO**

GUILHERME PORTELA COELHO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

Porto Alegre, RS
2005

C672r **Coelho, Guilherme Portela**

Relação entre os critérios diagnósticos histológicos e a expressão imuno-histoquímica da p53 no carcinoma prostático / Guilherme Portela Coelho ; orient. Maria Isabel Albano Edelweiss. – 2005.

169 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Neoplasias prostáticas 2. Carcinoma 3. Imunohistoquímica
4. Genes P53 5. Proteína P53 6. Biópsia 7. Proteínas S100 I.

Edelweiss, Maria Isabel Albano II. Título.

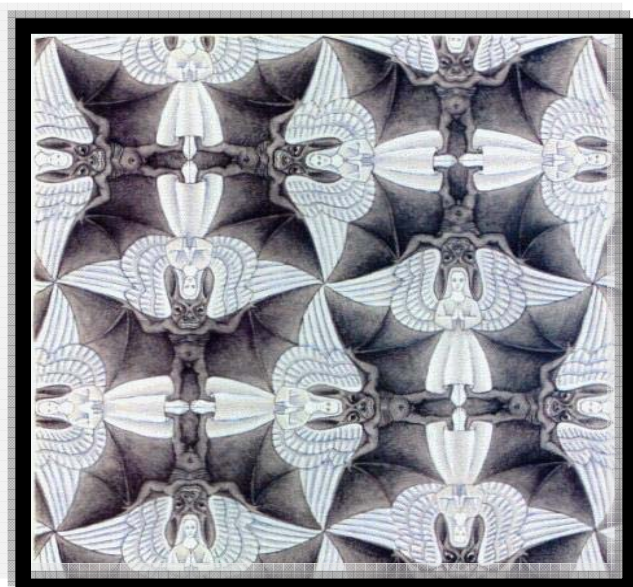
NLM: WJ 752

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

"Toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

Albert Einstein (1879-1955)

"Identificar tumores ao microscópio é mais complexo que procurar coincidir um padrão com um nome. Utilizamos o termo "feio" para caracterizar células malignas e fazemos isto porque o julgamento de atipia e pleomorfismo requer certo grau de julgamento estético e, nisto, o diagnóstico é impregnado pela personalidade do observador. Por isso que a patologia, assim como a medicina, é arte além de ciência. Estudantes de medicina tradicionalmente se angustiam diante do diagnóstico dos tumores: quanto de atipia é preciso para o veredicto de malignidade? Apenas a experiência pode dizer. Patologistas também se angustiam frente a certos tumores...O patologista preocupado que estuda estas lâminas sente-se como contemplando os anjos e demônios entrelaçados de Escher...



Anjos e demônios entrelaçados.
Gravura de M.C. Escher, artista holandês (1941).

...Felizmente, para aperfeiçoar a fidelidade do diagnóstico histológico, existem diretrizes específicas para o estudo de cada tipo de tumor, baseadas na estatística e na experiência. Um exemplo de autoridade internacionalmente reconhecida em patologia é representado pelos fascículos publicados pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas dos Estados Unidos (AFIP), que tem sido um dos mais importantes, efetivos, pacíficos e bem vindos embaixadores dos Estados Unidos."

Majno G, Joris I.
Anatomy and Biology of Tumors.
In: Cells, Tissues, and Disease.
Principles of General Pathology.
Blackwell Science; 1996.

Para Alexandra, minha querida esposa e meu amor, pelo apoio insistente sem o qual não chegaria a esta etapa da minha formação.

Aos meus Pais Celso e Maria Adélia pelo apoio sempre incondicional nos momentos difíceis.

À Professora Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss, pela confiança sincera no meu trabalho. O dinamismo e competência que a caracterizam e que marcam a sua trajetória científico-acadêmica são exemplo e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, por possibilitar a realização deste projeto.

Ao professor Dr. Walter J. Koff, chefe do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por possibilitar a realização deste projeto em sua linha de pesquisa.

Ao professor Carlos Thadeu Schmidt Cerski, atual chefe do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e ao professor Antônio Carlos Kruehl Pütten, chefe do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no início do projeto, local onde foram coletados os casos e analisadas as lâminas.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) pelo auxílio financeiro.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelas orientações na confecção do projeto de pesquisa.

Ao colega e co-autor do projeto de pesquisa Isnard Elman Litvin. Patologista criterioso e completo, pesquisador dedicado, amigo valoroso.

Aos professores, médicos patologistas contratados, funcionários e médicos residentes do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, local da minha formação como médico patologista.

Aos professores de pós-graduação em Cirurgia e dos demais programas desta Universidade com os quais tive oportunidade de crescer ética e intelectualmente.

Aos acadêmicos da Faculdade de Medicina de Caxias do Sul (UCS) Francine Henn de Oliveira e Lucas Torelly Filippi, pelo auxílio com os programas de computador de análise estatística e gerenciador de referências.

À equipe do Laboratório Diagnóstico de Caxias do Sul que me proporcionou tranquilidade nos momentos em que cursava os créditos do mestrado em Porto Alegre.

Às funcionárias Caroline Gubert de Almeida e Jurema Maria Finn do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Geral de Caxias do Sul, pelo auxílio na administração das minhas ausências enquanto me dedicava ao mestrado.

Aos professores Dr. Celso Piccoli Coelho e Dr. Eduardo Pretto Serafini do Departamento de Patologia por me substituírem em muitas oportunidades nas minhas atividades docentes na Universidade de Caxias do Sul.

Ao funcionário Adelmo Soliman do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela ajuda na seleção dos casos de punção-biópsia de próstata.

À funcionária Zeli Fogaça Pacheco do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela ajuda na separação dos blocos de parafina e lâminas.

À funcionária Flávia Giusti Grossmann do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela excelente qualidade das lâminas de imuno-histoquímica.

A Sra. Estela Maris Araripe, secretária do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, sempre competente e disponível.

Ao Dr. Mário B. Wagner, pela análise estatística e recomendações na interpretação e descrição dos resultados.

A Sra. Hedy Lorraine Hoffman, pela correção ortográfica em língua inglesa.

A Sra. Helen Flores, bibliotecária chefe da biblioteca FAMED/HCPA, pela elaboração da ficha catalográfica.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AC	Medida da área de carcinoma na biópsia (mm ²)
AF	Medida da área de fragmentos na biópsia (mm ²)
AFIP	Armed Forces Institute of Pathology – Washington – EUA
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMACR	Alfa-metil-CoA-racemase
CDK	Kinase dependente de ciclina
DAB	Diaminobenzidina
DHT	Di-hidrotestosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Solução tampão
EEP	Extensão Extra-Prostática
EUA	Estados Unidos da América
EsCa	Medida em unidades da estimativa da maior espessura dos fragmentos com carcinoma
EsF	Medida em unidades da estimativa da espessura do maior fragmento
ExCa	Medida em milímetros da extensão (comprimento) do carcinoma nos fragmentos acometidos
ExF	Medida em milímetros da extensão (comprimento) de fragmento
FAMED	Faculdade de Medicina
Fig	Figura
FIPE	Fundação de incentivo à pesquisa e eventos
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE	Método de coloração pelos corantes Hematoxilina e Eosina
HPV	Vírus do Papiloma Humano
IC	Intervalo de Confiança
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kD	kilodalton
LH	Hormônio Luteinizante
mM	milimol
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
MO	Microscópio Óptico
n	amostra
NIP	Neoplasia Intraepitelial Prostática
ng	nanogramas
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Probabilidade de que as diferenças encontradas tenham sido decorrentes do acaso.
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PAP	Fosfatase Ácida Prostática
PBS	Tampão Fosfato Salino
<i>phi</i>	Medida de associação baseada no qui-quadrado de Pearson
POA	Porto Alegre
POC	Proporção Objetiva de Carcinoma
PPG-Cirurgia	Programa de Pós-Graduação em Cirurgia
PSA	Antígeno Prostático Específico

RMO	Retículo de Medida Ocular
RR	Risco Relativo
RS	Rio Grande do Sul
r_s	Coefficiente de correlação de Spearman
RTU	Ressecção Transuretral
SPSS	Statistical Package for Social Science
TNM	Sistema de estadiamento de neoplasias
TR	Toque Retal
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
μm	Micrômetro/ $1\mu\text{m}=0,001\text{mm}$
US	Ultra-Sonografia Transretal
VPP	Valor Preditivo Positivo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Incidência estimada para 2005 de algumas neoplasias no Brasil	8
Tabela 2 - Valor preditivo positivo para presença de carcinoma da próstata em biópsias transretais de acordo com os achados do toque retal (TR) ultrasonografia (US) e valor do PSA, isolados ou combinados entre si	13
Tabela 3 - Critérios diagnósticos úteis na diferenciação do carcinoma prostático das doenças benignas da glândula	16
Tabela 4 - Critérios diagnósticos relacionados à arquitetura tecidual, úteis na diferenciação do carcinoma prostático das doenças benignas da glândula.....	17
Tabela 5 - Alguns marcadores imuno-histoquímicos mais utilizados em patologia prostática para o diagnóstico diferencial	19
Tabela 6 - Critérios histológicos para a graduação de Gleason	21
Tabela 7 - Etapas do trabalho	39
Tabela 8 - Características descritivas dos pacientes com carcinoma prostático	44
Tabela 9 - Distribuição dos pacientes segundo níveis de risco para recidiva bioquímica no carcinoma de próstata	45
Tabela 10 - Características descritivas das modalidades de aferição da imunorreatividade para <i>p53</i>	46
Tabela 11 - Distribuição dos escores de Gleason dos pacientes com carcinoma	46
Tabela 12 - Coeficiente de correlação entre os métodos de aferição da imunorreatividade para <i>p53</i> e achados clínicos e histológicos dos pacientes com carcinoma prostático	47
Tabela 13 - Coeficiente de concordância (<i>phi</i>) entre a imunorreatividade <i>em grupamento</i> para <i>p53</i> e presença de invasão neural por carcinoma prostático nos métodos HE e de imuno-histoquímica para a proteína S100	49
Tabela 14 - Frequência de critérios diagnósticos nos carcinomas prostáticos e relação com a imunorreatividade <i>em grupamento</i> para <i>p53</i> , parte I	49-50

Tabela 15 - Frequência de critérios diagnósticos nos carcinomas prostáticos e relação com a imunorreatividade <i>em grupamento</i> para <i>p53</i> , parte II	51
Tabela 16 - Estadiamento do carcinoma da próstata	74
Tabela 17 - Treze dicas para a graduação histológica de Gleason em biópsias por agulha	79-80
Tabela 18 - Etapas do trabalho de Litvin e colaboradores	81
Tabela 19 - Padronização das unidades (mm) do RMO	82
Tabela 20 - Alguns parâmetros para interpretação do tamanho do efeito	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de McNeal que divide anatomicamente e funcionalmente a próstata.....	11
Figura 2. Formação glomerulóide. HE, 400x.....	18
Figura 3. Desenho original de Gleason com a morfologia dos padrões para graduação histológica.....	20
Figura 4. Microscópio óptico Zeiss, modelo Standard 20.	36
Figura 5. Microscópio óptico Zeiss com retículo de medida inserido em uma ocular	37
Figura 6. Positividade para <i>p53 em grupamento</i> (15 ou mais núcleos corados - marrom - em campo de 400x).	45
Figura 7. Positividade para <i>p53</i> no tecido prostático, intensidade 1. 1000x.....	46
Figura 8. Positividade para <i>p53</i> no tecido prostático, intensidade 2. 1000x.....	46
Figura 9. Positividade para <i>p53</i> no tecido prostático, intensidade 3. 1000x.....	46
Figura 10. Invasão de nervo por carcinoma (HE 400x)	48
Figura 11. Invasão de nervo por carcinoma (S100,400x)	48
Figura 12. Invasão de nervo por carcinoma (S100,1000x).	48
Figura 13. Fibroplasia mucinosa (micronódulos de colágeno) (HE 400x).	50
Figura 14. Núcleos de carcinoma prostático com mais de um nucléolo proeminente (HE 1000x).	50
Figura 15. Marcação de nervo pela proteína S100 - 400x - e marcação de estruturas pelo mesmo anticorpo menores que o tamanho mínimo considerado como nervo.....	82

RESUMO

Introdução e Objetivo: o gene *TP53* é o alvo isoladamente mais comum de mutação em tumores humanos. Está envolvido no bloqueio do ciclo celular, reparo ao DNA, diferenciação celular e apoptose, em resposta ao dano genético. O exame de imuno-histoquímica (IHQ) pode detectar o acúmulo da proteína *p53* no núcleo celular, indicando mutação. Esta mutação tem sido associada a comportamento agressivo nos carcinomas prostáticos. O conhecimento das características histológicas deste carcinoma permite o estabelecimento de critérios diagnósticos anatomopatológicos e de graduações histológicas que visam a um melhor atendimento dos pacientes com a doença. O estudo da relação entre os achados de biologia molecular e as características histológicas desta neoplasia leva a um maior conhecimento de mecanismos que produzem as alterações morfológicas teciduais, auxiliando na identificação de novas variáveis promissoras na determinação do comportamento biológico da doença.

Material e Método: foram examinadas amostras de 101 exames de biópsias por agulha da próstata, de setenta pacientes com carcinoma, através de lâminas coradas pelo HE, selecionados de 500 exames consecutivos. Obtiveram-se novos cortes dos mesmos blocos de parafina, sendo estes corados pela técnica de IHQ, utilizando o anticorpo monoclonal DO7 para *p53*, em 69 dos pacientes. Foram anotados, para estudo de associação, os achados morfológicos de carcinoma, o padrão da coloração IHQ para *p53*, a presença de invasão de nervos (IN) pelas colorações HE e de IHQ para proteína S100 e algumas características clínico-laboratoriais dos pacientes com carcinoma prostático.

Resultados: dentre as formas de aferir a positividade IHQ da *p53*, a imunorreatividade *em grupamento* foi o padrão que melhor se correlacionou com os achados clínico-patológicos examinados: PSA sérico, escore de Gleason, quantidade de tumor na amostra ($p < 0,01$) e presença de invasão de nervo. Dentre os critérios diagnósticos estudados, houve associação estatisticamente significativa da imunorreatividade *em grupamento* para *p53* com as presenças de micronódulos de colágeno e mais de um nucléolo proeminente no mesmo núcleo de célula neoplásica. Quanto à IN, apenas quando a mesma foi identificada com a técnica de IHQ (proteína S100), houve associação estatisticamente significativa.

Conclusão: o padrão de imunorreatividade *em grupamento* mostra-se superior aos demais quando comparado aos achados anatomopatológicos com valor preditivo em biópsias e com o valor do PSA sérico. A associação estatisticamente significativa entre a imunorreatividade *em grupamento* para *p53* e a presença de IN detectada com a utilização da proteína S100 contrasta com a ausência de significância quando a IN é identificada na histologia convencional (HE). Estes achados recomendam novos estudos para verificar a utilidade da determinação IHQ da IN no prognóstico da doença e para identificar o mecanismo molecular de invasão de nervos de pequeno tamanho que não são facilmente identificados no HE. A presença da associação da positividade IHQ para *p53* com micronódulos de colágeno igualmente recomenda novos estudos clínicos e moleculares para esclarecimento da relação deste achado histológico com o comportamento biológico do carcinoma prostático.

Palavras-chave: carcinoma da próstata, *TP53*, S100, imuno-histoquímica, histologia, histopatologia, critérios diagnósticos, biópsia transretal.

ABSTRACT

Background: *TP53* is the single most common target of mutation in human tumors. It is involved in the blockage of the cell cycle, DNA repair, cell differentiation and apoptosis, in response to genetic damage. Immunohistochemistry (IHC) can detect the accumulation of the *p53* protein in the cell nucleus, indicating mutation. This finding has been associated with aggressive behavior in prostatic carcinomas. Knowing the histological characteristics of this carcinoma allows pathologic diagnostic criteria and grading systems to provide better care to patients who have this disease. The study of the relationship between molecular biology findings and the histological characteristics of this neoplasm leads to greater knowledge of the mechanisms that produce morphological changes in tissue, helping to identify promising new variables to determine the biological behavior of the disease.

Methods: samples of 101 needle biopsies of the prostate were examined, from seventy patients with prostatic carcinoma, in sections stained with hematoxylin and eosin (HE), selected from 500 consecutive examinations. New sections were obtained from the same paraffin blocks and were immunostained using the monoclonal antibody DO7 for *p53*, in 69 of the patients. For purposes of the association analysis, the morphological findings, the pattern of immunostaining for *p53*, the presence of perineural invasion (by HE and IHC staining for S100 protein) and some clinical and laboratory characteristics of patients with prostatic carcinoma were noted.

Results: among the ways used to measure IHC positivity for the *p53*, clustered immunostaining was best correlated with the clinicopathologic findings examined: serum PSA, Gleason score, amount of tumor in the sample ($p < 0.01$) and the presence of perineural invasion (PNI). Of the diagnostic criteria, there was a statistically significant association of clustered *p53* immunostaining with the presence of collagen micronodules and the finding of more than one prominent nucleolus in the same nucleus of neoplastic cell. Statistically significant association also occurred when PNI was identified with S100 protein.

Conclusion: clustered *p53* immunostaining was best correlated than others staining patterns, when compared to the pathologic findings with prognostic value in biopsies and with the serum PSA. The statistically significant association of clustered *p53* immunostaining and the presence of PNI detected with the use of S100 protein contrasts with the absence of significance when PNI was identified in conventional histology (HE). New studies are recommended to verify the usefulness of IHC detection of PNI in the prognosis of the disease and to identify the molecular mechanism of invasion of small nerves that are not easily identified in HE stained slides. The presence of the association of IHC positivity for *p53* with collagen micronodules also recommends new clinical and molecular studies to account for the relationship between this histological finding and the biological behavior of prostatic carcinoma.

Key words: prostatic carcinoma, *TP53*, S100, immunohistochemistry, histology, histopathology, diagnostic criteria, needle biopsy.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	XI-XIII
LISTA DE TABELAS	XIV-XV
LISTA DE FIGURAS	XVI
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
SUMÁRIO	XIX-XX
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 FUNDAMENTOS MOLECULARES DO CÂNCER.....	1
1.1.1 <i>TP53</i>	3
1.2 CARCINOMA DA PRÓSTATA.....	5
1.2.1 Epidemiologia.....	6
1.2.2 Etiologia.....	8
1.2.3 Localização na glândula.....	10
1.2.4 Diagnóstico.....	12
1.2.4.1 Obtenção das amostras de tecido.....	13
1.2.4.2 Histologia.....	14
1.2.4.3 Histopatologia.....	15
1.2.4.4 Perfil imuno-histoquímico.....	18
1.2.4.5 Graduação histológica.....	19
1.2.5 Disseminação tumoral e estadiamento.....	22
1.2.6 Tratamento.....	22
1.2.6.1 Cirúrgico.....	22
1.2.6.2 Radioterápico.....	23
1.2.6.3 Hormonal.....	23
1.2.6.4 Conservador.....	23
1.2.6.5 Quimioterápico.....	24
1.2.7 Fatores prognósticos e preditivos no carcinoma prostático.....	24
1.2.7.1 Invasão de nervos.....	25
1.2.7.2 Marcadores moleculares.....	26
1.3 AVALIAÇÃO POR IMUNO-HISTOQUÍMICA DA SUPEREXPRESSÃO DA <i>p53</i> NO CARCINOMA PROSTÁTICO.....	27
2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	31
3 OBJETIVOS DO ESTUDO	32
4 MATERIAL E MÉTODO	33
4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA.....	33
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	33
4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	34
4.4 PARÂMETROS CLÍNICOS.....	34
4.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	34
4.6 PREPARAÇÃO DO MATERIAL.....	35

4.7	INSTRUMENTOS DE AFERIÇÃO.....	35
4.7.1	Microscópio Óptico (MO)	35
4.7.2	Régua Milimetrada.....	36
4.7.3	Retículo de Medida Ocular (RMO)	36
4.7.4	Régua Microscópica.....	38
4.8	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	38
4.8.1	Medida da Área dos Fragmentos (AF).....	39
4.8.2	Medida da Área de Carcinoma (AC)	40
4.8.3	Proporção Objetiva de Carcinoma (POC).....	40
4.9	AFERIÇÃO DA POSITIVIDADE PARA <i>p53</i> POR IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	41
4.10	BASE DE DADOS	42
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	42
4.11.1	Programa Estatístico	43
4.12	ASPECTOS BIOÉTICOS	43
4.13	FINANCIAMENTO	43
5	RESULTADOS	44
6	DISCUSSÃO.....	52
7	CONCLUSÕES.....	59
8	PERSPECTIVAS.....	60
9	REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	72
	ANEXO 1: estadiamento patológico.....	72
	ANEXO 2: técnica da imuno-histoquímica.	75
	ANEXO 3: graduação de Gleason em biópsias.	79
	ANEXO 4: etapas do trabalho de dissertação de mestrado de Litvin relevantes para o entendimento dos métodos de avaliação de invasão de nervos pelo carcinoma prostático.....	81
	ANEXO 5: coeficientes de correlação e associação - padronização de tamanho de efeito.....	84
	ARTIGO: RELAÇÃO ENTRE OS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS HISTOLÓGICOS E A EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA <i>p53</i> NO CARCINOMA PROSTÁTICO.	85
	ARTIGO: RELATIONSHIP BETWEEN HISTOLOGICAL DIAGNOSTIC CRITERIA AND THE IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF <i>p53</i> IN PROSTATIC CARCINOMA.	118

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 FUNDAMENTOS MOLECULARES DO CÂNCER

O DNA de uma célula não é uma molécula estática. Frequentemente suas bases estão expostas a agentes, naturais ou artificiais, que provocam modificações na sua estrutura e na sua composição química.^{1,2} Modificações súbitas ou hereditárias no material genético são denominadas mutações. Uma mutação de ponto envolve modificação em um único par de bases (substituição, adição ou deleção) e pode ser o resultado do mau funcionamento do sistema celular que replica ou repara o DNA.¹ As mutações podem ocorrer em qualquer célula e em qualquer estágio do ciclo celular. No entanto, somente aquelas que ocorrerem em células germinativas é que serão transmitidas à descendência.^{1,3} Mutações em células somáticas são perpetuadas apenas nas células que descenderem da célula original na qual a mutação ocorreu e podem não afetar o organismo inteiro.

O dano não letal ao DNA é o cerne da carcinogênese. Este dano pode ser adquirido através da ação de agentes químicos, físicos (p.ex. radiação) e/ou biológicos (p.ex. vírus).^{1,2,4} A hipótese genética do câncer tem na sua fundamentação a premissa de que os tumores* são expansões clonais de uma única célula que sofreu dano ao seu material genético.³

* A palavra tumor não necessariamente significa câncer ou mesmo neoplasia, e pode ser traduzida literalmente por um aumento de volume de qualquer etiologia. Entretanto, atualmente, este termo é utilizado como sinônimo de neoplasia. Sendo assim, este último significado, já consagrado pelo uso, é o que lhe deve ser atribuído na leitura do presente texto.

Três classes de genes reguladores são os principais alvos do dano relacionado ao câncer: os proto-oncogenes[†] ou genes promotores da multiplicação celular, os anti-oncogenes (genes de supressão tumoral) e os genes que se associam ao processo de morte celular programada ou apoptose. Os alelos mutantes dos proto-oncogenes costumam ser dominantes enquanto que os dos anti-oncogenes recessivos. Os genes relacionados a apoptose podem se comportar das duas formas. Uma quarta categoria importante na carcinogênese inclui genes que se associam a função de reparo do DNA lesado. Estes estão implicados na multiplicação e na sobrevivência celular indiretamente, na medida em que habilitam o organismo a reparar o dano não letal a outros genes (incluindo os proto-oncogenes, anti-oncogenes e genes que regulam a apoptose). Ambos os alelos dos genes reguladores do reparo ao DNA devem ser inativados para que seja induzida instabilidade genômica.³

Apesar das funções dos genes relacionados ao ciclo celular, à apoptose e ao reparo a danos ao DNA, inicialmente, parecerem suficientes para o desenvolvimento do câncer, atualmente tem-se a noção de que para o desenvolvimento de todas as características de uma neoplasia maligna, é importante que ocorram cinco ou seis etapas independentes que incluem: a) inativação de anti-oncogenes e/ou genes de reparo ao DNA e/ou genes associados à apoptose, b) mutação com hiperfunção de proto-oncogenes, c) surgimento de alterações relacionadas à adesividade intercelular, d) aquisição de capacidade de infiltrar outros tecidos, e) estimular a angiogênese e f) desenvolver habilidade para sobreviver na corrente sanguínea.^{2,3} A presença de disfunção em genes que previnem ocorrência ou perpetuação de mutações no DNA desempenha papel central no processo.

[†] Dos quais derivam os oncogenes.

1.1.1 *TP53*

O gene *p53* ou *TP53* é um dos genes relacionados ao câncer mais estudados. Codifica uma proteína de 53kD com o mesmo nome, a *p53*, que é responsável pela sua função biológica.⁵ Está localizado no cromossomo 17p13.1 e é o alvo isoladamente mais comum de mutação em tumores humanos.^{3,6-9} Mais de 70% dos tumores humanos contém algum defeito neste gene e grande parte dos que não apresentam este defeito têm outros em genes que influenciam na sua expressão.³ Suas atividades normais compreendem: a) parar temporariamente o ciclo celular prolongando a fase G1, entre a mitose e a fase de síntese, promovendo tempo extra para reparo a dano no DNA; b) desencadear o processo de apoptose na célula também em resposta a dano no DNA; c) estimular a transcrição de genes relacionados com a diferenciação dos tecidos, encaminhando a célula a um sentido oposto ao da carcinogênese.^{3,5,7,9-12}

A explicação para esta multiplicidade de funções pode ser obtida no fato de que a proteína codificada por este gene tem sítios de ligação em vários pontos da cadeia do DNA, promovendo controle da expressão de vários outros genes.^{4,13} A falta da função normal do *TP53* priva a célula de um importante mecanismo de proteção contra o desenvolvimento ou aumento da agressividade de uma neoplasia.⁶

Na maioria dos casos, as mutações que afetam ambos os alelos ocorrem em células somáticas e, menos comumente, alguns indivíduos herdam mutação em uma das cópias. Estes indivíduos, conhecidos como portadores da síndrome de Li-Fraumeni, têm chance 25 vezes maior do que a população geral de desenvolver um tumor maligno até os 50 anos de idade.^{3,14}

O fato desta mutação ser encontrada em vários tipos de câncer sugere que a ação da proteína *p53* seja comparada a de um guardião contra a formação de neoplasia, exercendo funções anti-proliferativas e, não menos importantes, reguladoras da apoptose, prevenindo a propagação de células geneticamente prejudicadas.^{10,15}

A *p53* é produzida para agir em situações onde o DNA é danificado. Após um dano causado por agentes mutagênicos, por mecanismos ainda não bem identificados, acontecem modificações na produção desta proteína.^{3,9} O bloqueio do ciclo celular ocorre tardiamente na fase G1 e é causado pela transcrição do gene *P21*.^{3,11} A proteína *p21* é responsável pela inibição da cinase dependente de ciclina (CDK), através do bloqueio da formação do complexo ciclina/CDK, prevenindo, conseqüentemente a fosforilação da *Rb*, necessária para que as células entrem na fase S do ciclo.^{3,11,16} A *p53* ainda auxilia neste processo induzindo diretamente a transcrição da *gadd45*, uma proteína envolvida no reparo do DNA.³ Se o DNA lesado é reparado, a *p53* ativa o gene *MDM2*, cujo produto se liga ao *TP53* e o regula para um estado de menor atividade, aliviando o bloqueio do ciclo celular.¹⁷ Se, durante a pausa, o DNA não puder ser reparado, a *p53* induz a ativação de genes promotores da apoptose, como o *BAX*, e antagoniza o gene inibidor da apoptose *BCL-2*.³ É importante enfatizar que a ativação de genes como o *P21*, *GADD45* e *BAX* é crucial para o funcionamento normal do *TP53*.

Além das situações já expostas, o *TP53* pode ainda ser ativado em momentos de hipóxia⁶, nestes casos, quando há mutação do mesmo, células de tumores tornam-se resistentes à apoptose mediada pela isquemia.^{3,6} O *TP53* parece também inibir a angiogênese¹² induzindo a produção da molécula trombospondina-1, que tem efeito anti-angiogênico.³ Adicionalmente a mutações herdadas e/ou somáticas, as funções do *TP53* podem ser inativadas por proteínas de vários vírus de DNA, como a proteína *E6* do vírus do

papiloma humano (HPV) que pode ligar-se ao *TP53* e degradá-lo.¹⁸ A habilidade do *TP53* em controlar a apoptose desencadeada pelo dano ao DNA tem também implicações terapêuticas na medida em que duas das formas mais utilizadas de tratamento para o câncer (quimioterapia e radioterapia) têm seus efeitos induzidos por dano ao DNA e conseqüente apoptose.^{16,19-21}

Hoje sabe-se que o *TP53* é, na verdade, um membro de uma família de genes múltiplos. O gene *P73*, um outro membro desta família, está localizado no 1p36 e codifica uma proteína que é 60% homóloga à *p53*. O membro mais novo da família é o *P63*. É provável que, pelo menos em alguns tecidos, a deficiência de *p53* possa ser compensada pela expressão dos outros genes da família.²²

1.2 CARCINOMA DA PRÓSTATA

O carcinoma prostático tem participação significativa na incidência de câncer no mundo, principalmente em países ocidentais, onde é a neoplasia maligna mais freqüente em homens, excluindo-se os cânceres cutâneos não-melanocíticos.^{23,24} O número de novos casos tem aumentado continuamente nas últimas décadas, em parte devido ao aumento da expectativa de vida, em parte devido aos programas de rastreamento. Fatores adicionais, nos países industrializados, são o alto valor calórico da dieta e a pouca atividade física. Dados epidemiológicos indicam que negros são mais suscetíveis, seguidos pelos brancos, e que a população de origem asiática tem o menor risco.^{23,25,26,27}

O diagnóstico e a graduação histológicos desempenham um papel importante na assistência aos pacientes com esta doença. O tipo histológico mais freqüente e que responde pela quase totalidade dos casos diagnosticados é o carcinoma do tipo acinar.²³

O carcinoma prostático, em relação ao comportamento biológico, pode ser dividido em clínico e histológico.²⁵ O primeiro é o carcinoma com manifestações clínicas, correspondendo aos estágios T2, T3 e T4 (ver anexo 1). Histológico (ou latente) é o carcinoma que não evolui para a forma clínica ou que progride de forma muito mais lenta que o carcinoma clínico.²⁵ Grande parte dos estudos na área de câncer da próstata visa a identificar fatores prognósticos e preditivos[‡] nesta neoplasia para definir quais lesões se enquadram no grupo dos carcinomas latentes e quais os casos em que a lesão pode ser biologicamente agressiva. Alguns parâmetros clínico-laboratoriais e histológicos já são utilizados com este fim, mas ainda espera-se uma contribuição mais efetiva da biologia molecular.

1.2.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer de próstata é atualmente o sexto tipo de câncer mais comum no mundo (em termos de número de novos casos).²³ O número estimado de casos foi de 543 mil no ano de 2000.²⁹ Isto representa 9,7% dos cânceres em homens (15,3% em países desenvolvidos e 4,3% em países subdesenvolvidos).²³ Entretanto, é uma causa menos importante de morte por câncer quando comparada à incidência, com 201.000 mortes (5,6%

[‡] Os termos “fator prognóstico” e “fator preditivo” têm sido utilizados com bastante freqüência na literatura médica. Fator prognóstico refere-se essencialmente aos achados que prevêm eventos relacionados à história natural da neoplasia. Fator preditivo é o que visa a prever eventos que não são produzidos única ou diretamente pela biologia tumoral (p.ex. a probabilidade de resposta satisfatória à determinada terapêutica)²⁸.

das mortes em homens e 3,6% de todas as mortes por câncer).²³ A baixa letalidade significa que muitos homens permanecem vivos após o diagnóstico de câncer prostático. Em tempos recentes, as taxas de incidência não refletem apenas as diferenças de risco da doença nos diferentes locais, mas também a expansão de diagnósticos de casos latentes secundários à triagem em indivíduos assintomáticos e aos casos de diagnóstico em material de cirurgia prostática indicada por outros motivos ou provenientes de necropsia.^{23,25} O Ministério da Saúde (tabela 1) estima para o ano de 2005 a ocorrência em todo o Brasil de 467.440 casos novos de câncer. Para o sexo masculino são estimados 229.610 novos casos. A principal neoplasia maligna a acometer a população brasileira é a de pele não-melanocítica com 113.020 novos casos. No homem, esta mesma neoplasia apresentará cerca de 56.420 novos casos, seguida pela da próstata com 46.330.

Na mesma estimativa ²⁹, para o Rio Grande do Sul, o carcinoma prostático aparece como uma taxa bruta de incidência de 83,48 casos/100.000 habitantes (4.440 casos novos). Em Porto Alegre, o carcinoma da próstata apresentará uma taxa de incidência de 107,28 casos /100.000 habitantes (730 casos).

A análise da estimativa de mortalidade por câncer mostra que, para o Brasil, em 2003, o carcinoma de pulmão (com taxa bruta de 13 casos/100.000 habitantes) foi a primeira causa de mortalidade para o sexo masculino, seguido pelo carcinoma da próstata (9,47 casos/100.000 habitantes). No Rio Grande do Sul, o carcinoma da próstata, para o mesmo período, apresentou taxa de mortalidade de 15,73 casos/100.000 habitantes (810 casos), vindo logo atrás do câncer de pulmão.

Tabela 1: Incidência estimada para 2005 de algumas neoplasias malignas em homens no Brasil ²⁹

Neoplasias malignas		Número de novos casos	Taxa bruta de incidência*
Total	Brasil	229.610	253,24
	RS	25.630	482,01
	POA	3.870	572,35
Próstata	Brasil	46.330	51,12
	RS	4.440	83,48
	POA	730	107,28
Pulmão	Brasil	17.110	18,88
	RS	2.760	51,87
	POA	390	57,04
Pele não-melanocítica	Brasil	56.420	62,22
	RS	4.940	92,97
	POA	520	76,26

* número de novos casos por 100.000 habitantes. RS: Rio Grande do Sul. POA: Porto Alegre.

1.2.2 ETIOLOGIA

O risco de câncer de próstata aumenta progressivamente com a idade. A incidência de doença clinicamente relevante é baixa antes dos 50 anos. Cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem em homens com mais de 65 anos.^{23,25,26}

As marcadas diferenças étnicas no risco de carcinoma prostático sugerem que fatores genéticos possam ser pelo menos em parte responsáveis pela origem do mesmo. Um estudo de coorte com profissionais de saúde nos Estados Unidos evidenciou que as possíveis diferenças de dieta e estilo de vida não explicam o maior risco (RR 1,81) de câncer de próstata em negros comparados com brancos.³⁰ De maneira similar, em São

Paulo o risco de câncer de próstata em negros é de 1,8 (I.C. 95% 1,4-2,3) vezes maior que em brancos.³¹

A história familiar também fala a favor da participação de fatores genéticos, pois há um risco de 5-11 vezes maior para o desenvolvimento do câncer prostático em pessoas com dois ou mais parentes de primeiro grau com a doença.³²

As alterações com o tempo nas populações migrantes também sugere que os fatores ambientais sejam importantes.²³

Evidências de estudos ecológicos, de casos e controles e de coorte associam o consumo de gorduras com a etiologia do câncer de próstata, principalmente através da constatação da associação entre a quantidade de consumo calórico e esta neoplasia. Há também uma associação fortemente positiva com o consumo de produtos de origem animal, especialmente carne vermelha.²³ Parece existir um efeito protetor do licopeno presente nos tomates na gênese do câncer da próstata.³³

Billis e colaboradores, em necropsias, não demonstraram diferença significativa entre brancos e negros na prevalência de carcinoma latente. É possível que não haja a mesma diferença étnica de risco para carcinomas latentes, sendo os últimos influenciados por fatores ambientais distribuídos difusamente.²⁵

É evidente também que os androgênios desempenham papel importante, pois seu metabólito mais ativo, a di-hidrotestosterona (DHT), age ativando genes ligados a divisão celular na próstata.²³ Vários polimorfismos[§] do gene do receptor androgênico têm sido estudadas. Há a hipótese de que com alguns destes polimorfismos, o câncer de próstata possa crescer mesmo com baixos níveis séricos de androgênios. O domínio amino-terminal

[§] Os polimorfismos constituem-se de ocorrência em uma população de várias formas fenotípicas associadas com alelos de um gene ou homólogos de um cromossomo. O polimorfismo é um tipo de variação onde indivíduos distintos co-existem como normais.

codificado pelo exon 1 demonstra uma alta proporção de repetições polimórficas CAG. A quantidade destas repetições tem sido associada com um risco aumentado para desenvolvimento de carcinoma prostático e com progressão da doença.²³

Fatores ambientais como exposições ocupacionais e hábito sexual estão sob investigação.

A lista de genes em estudo possivelmente relacionados à etiologia do carcinoma prostático é grande e as maiores vias que estão sob investigação são as envolvidas na ação androgênica, no reparo ao DNA, no metabolismo de carcinógenos e na inflamação.^{23,34} Assume-se que combinações específicas destas, em circunstâncias ambientais favoráveis, podem propiciar o desenvolvimento do carcinoma prostático.

1.2.3 LOCALIZAÇÃO NA GLÂNDULA

A maioria dos casos de carcinoma prostático diagnosticados por punção-biópsia transretal e clinicamente relevantes originam-se na zona periférica²³ (fig.1), situada nas regiões posterior e póstero-lateral da glândula.^{23,26,27,25,35,36} Mesmo carcinomas não-palpáveis detectados na punção-biópsia transretal são originados principalmente na zona periférica.³⁷ Os tumores diagnosticados em ressecções trans-uretrais da próstata são mais frequentemente originados na zona de transição. Em poucos casos, tumores grandes localizados na zona de transição podem estender-se para a zona periférica e se tornarem palpáveis. Tumores grandes podem, também, estender-se para a zona central, enquanto que tumores originados nesta região são incomuns. Carcinomas multifocais estão presentes em mais de 85% das próstatas.³⁸

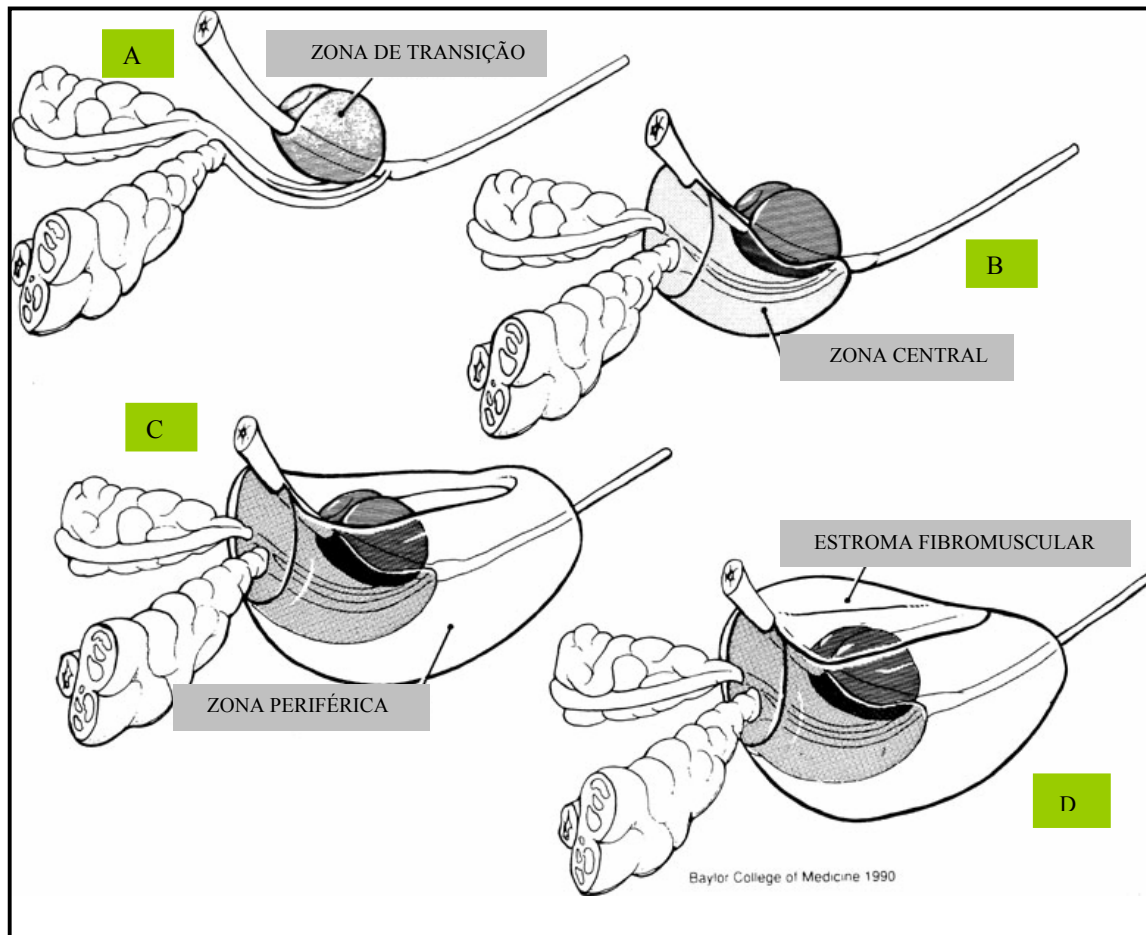


Fig. 1: Esquema de McNeal³⁶ que divide anatomicamente e funcionalmente a próstata. A: zona de transição e representação da uretra, com flexão formando ângulo de 45 graus, e dos ductos ejaculatórios. Na zona de transição costuma ocorrer a hiperplasia nodular. B: zona central. Conjunto de glândulas na forma de uma pirâmide invertida. Não é local comum de origem de doenças da glândula. C: zona periférica. Estende-se desde o terço superior até o ápice da próstata, respondendo por grande parte do tecido das regiões posterior e laterais da glândula. Local de origem da maioria dos carcinomas prostáticos. D: modelo teórico da glândula considerando-se as três zonas, a uretra prostática, os ductos ejaculatórios e o estroma fibromuscular anterior.

1.2.4 DIAGNÓSTICO

Pelo fato da maioria dos carcinomas originarem-se na zona periférica, um aumento na região da zona de transição que cause sintomas obstrutivos mais provavelmente significa hiperplasia nodular. Raramente, obstrução urinária é resultado de tumores grandes que infiltram a zona de transição. Doença localmente avançada com extensão suficiente para provocar dor pélvica e sangramento ou obstrução retal é, nos dias de hoje, bastante menos freqüente do que no passado.²³ Carcinomas com metástases podem apresentar dor óssea, principalmente na pelve e na coluna vertebral.²⁷

O PSA é uma enzima proteolítica de 33 kD produzida pelo epitélio prostático normal ou neoplásico. É secretado em grande quantidade nos lúmens dos ácinos prostáticos e no sistema ductal e, conseqüentemente, no fluido seminal, onde aumenta a motilidade dos espermatozoides e mantém o sêmen em estado líquido.³ Ele é encontrado no tecido prostático normal, hiperplásico ou maligno e apresenta grande utilidade clínica, servindo para a detecção do carcinoma prostático, para a avaliação da extensão da neoplasia, para a determinação do prognóstico e para o monitoramento da resposta terapêutica.³⁹ Em geral, o nível sérico do PSA total acima de 4,0 ng/ml é considerado anormal.²³ Formas diferentes de PSA existem no soro, sendo resultantes de associações entre o PSA livre e dois importantes inibidores de proteases produzidos pelo fígado. O PSA está aumentado em níveis maiores que 4,0ng/ml na maioria dos carcinomas prostáticos, mas pode atingir estes níveis em doenças benignas como hiperplasia nodular e inflamações. Carcinomas prostáticos podem acontecer sem elevação significativa dos níveis do PSA.⁴⁰

O toque retal é muito importante na avaliação de doença prostática e deve ser associado à dosagem do PSA para a detecção do carcinoma da próstata. Um trabalho

realizado na UNICAMP por Magrini e colaboradores ²⁵ mostrou o valor preditivo positivo (VPP) do PSA para a presença de adenocarcinoma em biópsias transretais da próstata de acordo com os achados de toque retal e ultra-som (tabela 2). Este estudo demonstrou que quando o PSA e o exame físico (toque retal) são simultaneamente anormais, a chance de carcinoma prostático ser encontrado em biópsia da glândula é bastante grande.

Tabela 2: Valor preditivo positivo para presença de carcinoma da próstata em biópsias transretais de acordo com os achados do toque retal (TR), ultra-sonografia (US) e valor de PSA, isolados ou combinados entre si.²⁵

Método	VPP (%)
TR “suspeito”	41,9
US “suspeita”	52,3
TR + US “suspeitos”	67,9
US “suspeita” + PSA > 10,0 ng/ml	71,4
PSA > 10,0 ng/ml	76,9
TR “suspeito” + PSA > 10,0 ng/ml	92,3

1.2.4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO

O método utilizado atualmente para diagnóstico do carcinoma prostático é a biópsia transretal guiada por US. Biópsias direcionadas por achados clínicos ou de US devem ser adicionadas de biópsias sistemáticas de acordo com um protocolo padronizado.

O protocolo chamado sextante inclui biópsias do centro de cada lado da zona periférica no ápice, terço intermediário e base da glândula. Várias modificações foram propostas neste protocolo, sendo adicionados novos locais com mais ampla amostragem. Uma maior acurácia se relaciona com a amostragem de regiões mais laterais da zona periférica (biópsias lateralmente dirigidas), onde alguns tumores se localizam.²³

Quando material de ressecção transuretral (RTU) da próstata é retirado sem suspeita clínica de câncer, carcinomas prostáticos são diagnosticados em cerca de 10% dos espécimes.²³ Carcinomas detectados nestes materiais são frequentemente originados na zona de transição, mas podem também corresponder a tumores grandes da zona periférica.⁴¹ É recomendável que a quantidade de tumor seja mencionada no diagnóstico na forma de percentagem.^{23,26,27} Se a lesão ocupar menos que 5% do volume do material, o estágio é T1a, se em mais de 5%, T1b. Se o escore de Gleason (ver item 1.2.4.5) é de 7 ou mais, o caso deve ser tratado como T1b independentemente da quantidade de lesão.²³ A amostragem de tecido da ressecção trans-uretral pelo patologista, para exame histológico, deve obedecer sistematicamente a algum protocolo, pois os carcinomas, quando presentes, não são visíveis macroscopicamente.²⁶

1.2.4.2. HISTOLOGIA

As glândulas prostáticas são constituídas por ácinos e ductos. Tanto os ácinos quanto os ductos possuem uma camada de células secretoras, cúbicas ou cilíndricas altas, com núcleos situados basalmente.²⁵ A camada basal, situada entre as células secretoras e a lâmina basal, tem a função principal de armazenar células de reserva.³⁶ Ao contrário da

mama onde as células nesta localização têm características mioepiteliais, as células basais da próstata não têm função contrátil. Esta função é exercida pelo estroma chamado de fibromuscular.³⁶

1.2.4.3 HISTOPATOLOGIA

Adenocarcinomas prostáticos variam desde cânceres que formam ácinos^{**} ou glândulas bem diferenciadas, onde eventualmente pode ser difícil de defini-los como carcinomas, até tumores pobremente diferenciados, onde pode ser difícil determinar que a origem do câncer seja prostática. Uma característica comum é a ausência de células basais, em contraste com o epitélio prostático benigno.^{25,26,27} O reconhecimento destas células basais nem sempre é simples em lâminas coradas pelo método da hematoxilina e eosina (HE).^{42,43} O diagnóstico do carcinoma prostático depende do reconhecimento de uma quantidade grande de características teciduais que podem ser arquiteturais, nucleares, citoplasmáticas ou intraluminares dos ácinos neoplásicos.^{23,26,27,42-44} O estudo de critérios diagnósticos no carcinoma da próstata é importante, pois cada vez mais os patologistas se deparam com quantidades menores de lesões nos procedimentos de biópsia transretal.⁴⁴⁻⁴⁷ Alguns achados são mais característicos dos carcinomas prostáticos do que do tecido benigno e podem ser úteis no diagnóstico diferencial. Alguns destes estão listados nas tabela 3 e 4.

^{**} A palavra ácino refere-se à unidade secretora funcional histológica de algumas glândulas exócrinas, sendo representada freqüentemente por um agrupamento de células organizadas em torno de um espaço (lúmen) que receberá o produto da secreção das mesmas. Na histologia e principalmente em histopatologia, estas estruturas são chamadas também de glândulas quando descritas ao microscópio óptico. Sendo assim, neste texto, se poderá encontrar a palavra glândula como sinônimo de ácino, quando o contexto for de exame histológico com microscopia óptica.

Tabela 3: Critérios diagnósticos úteis na diferenciação do carcinoma prostático das doenças benignas da glândula.

Ausência de células basais

Citologia

Núcleo

Nucleomegalia

Hipercromasia

Figuras de mitose

Nucléolo

Proeminente (>3-4 μ m)

Múltiplo

Excêntrico

Citoplasma

Anfófilico

Pálido

Borda luminar sem ondulações

Conteúdo intraluminal

Mucina

Material eosinofílico granular

Cristalóides

Necrose

Outros

Micronódulos de colágeno (fibroplasia mucinosa)

Neoplasia intraepitelial prostática associada

Tabela 4: Critérios diagnósticos relacionados à arquitetura tecidual, úteis na diferenciação do carcinoma prostático das doenças benignas da glândula.

Arquitetura tecidual

<u>Arquitetura glandular</u>	Pequenas glândulas amontoadas
	Glândulas relativamente uniformes
	Glândulas de aspecto diferente das vizinhas
	Estruturas (formações) glomerulóides
<u>Indicativos de invasão</u>	Pequenas glândulas infiltradas em meio a glândulas benignas
	Desmoplasia
	Glândulas orientadas perpendicularmente entre si
	Confluência de glândulas, cordões ou células isoladas
	Rompimento de fibras musculares
	Invasão de nervo
	Invasão de vaso sanguíneo
	Extensão extra-prostática (invasão de tecido adiposo)

Os achados de formações glomerulóides, fibroplasia mucinosa (ou micronódulos de colágeno) e a invasão de nervos são considerados específicos para carcinoma por não serem descritos em glândulas benignas.^{45,46,48} As formações glomerulóides são ácinos com proliferações luminares de células em conformação cribriforme aparentemente aderidas a um ponto da “parede” deste mesmo ácino, lembrando a estrutura de um glomérulo (fig. 2).

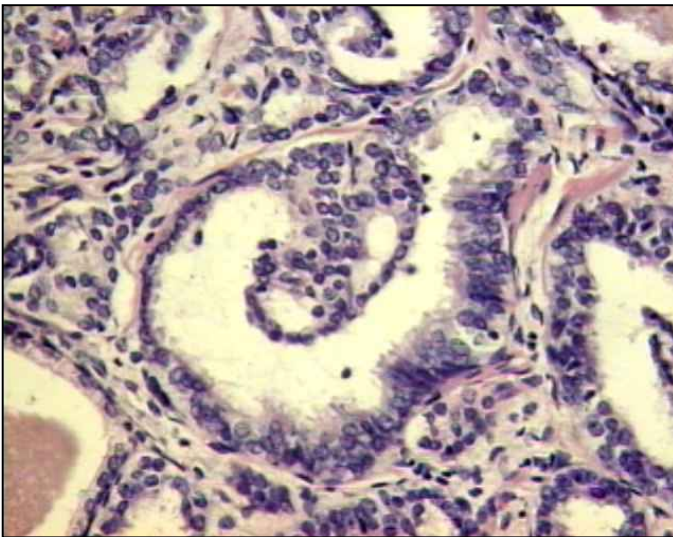


Fig. 2: Formação glomerulóide (HE 400x).

A fibroplasia mucinosa caracteriza-se por um tecido fibroso pouco celular em forma de pequenos nódulos possivelmente correspondendo a uma reação estromal, classicamente atribuída ao extravasamento de conteúdo luminal mucóide dos ácinos malignos. O estudo de Arangelovich e colaboradores ⁴⁹ que analisou estas estruturas ultra-estruturalmente, refere que as mesmas são constituídas por bandas de colágeno fragmentadas envoltas por material semelhante à membrana basal. No referido estudo, não foi encontrado resquício de muco nestas estruturas. A invasão de nervos é um achado específico desde que diferenciada de justa-posição de nervos por glândulas benignas, fator que pode confundir o observador. ^{27,42,43,47,48}

1.2..4.4 PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO

Alguns marcadores podem se mostrar úteis na definição de casos difíceis ^{23,26,27}, onde o diagnóstico diferencial pode ser entre carcinoma prostático e tecido prostático benigno, e carcinoma prostático e neoplasias não prostáticas (Tabela 5).

Tabela 5: Alguns marcadores imuno-histoquímicos mais utilizados em patologia prostática para o diagnóstico diferencial.

Marcador de imuno-histoquímica	Utilidade
Antígeno prostático específico (PSA)	Positivo para células prostáticas benignas ou malignas.
α -Metil-CoA-racemase (AMACR)	Auxilia na confirmação do diagnóstico de carcinoma, principalmente quando associada a um marcador de células basais.
Citoqueratina de alto peso molecular (clone 34 β E12)	Marcador de célula basal, deve ser negativo no carcinoma.
Fosfatase ácida prostática (PAP)	Semelhante ao PSA.
<i>p63</i>	Marcador de célula basal, deve ser negativo no carcinoma.

1.2.4.5 GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA

Vários sistemas de graduação histológica já foram propostos. O sistema de Gleason é atualmente o sistema predominante^{23,26,27}, sendo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS).²³ Este sistema define 5 padrões histológicos, ou graus^{††}, representando diferenciação histológica decrescente (figura 3 e tabela 6).

Nos padrões de Gleason 1 a 3 as células retêm sua polaridade em torno do lúmen em virtualmente todas as glândulas. No padrão 4 há uma perda parcial desta polarização e no padrão 5, há uma perda quase total da mesma. O carcinoma prostático caracteriza-se por

^{††} Serão preferidos, neste texto, para evitar problemas no entendimento do mesmo, as palavras **escore** e **padrão** para se designar, respectivamente, a graduação final ou “soma” (variando de 2-10) e os “graus” histológicos ou descrição dos padrões originais de D.F. Gleason (variando de 1-5).

uma pronunciada heterogeneidade morfológica e usualmente mais de um padrão é encontrado no mesmo caso.

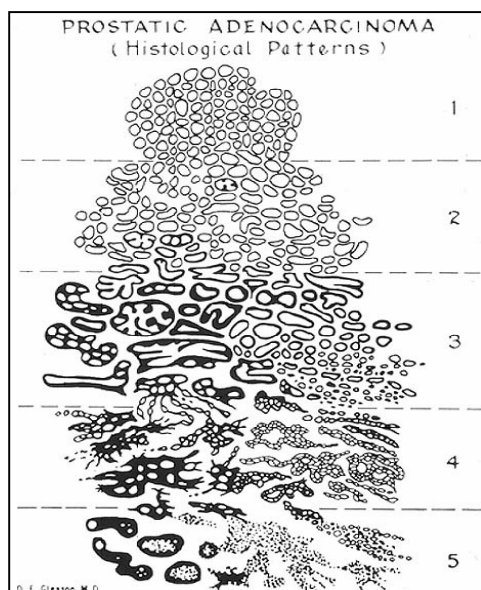


Fig. 3: Desenho original de D. F. Gleason com a morfologia dos padrões para graduação histológica.²⁷

O padrão mais freqüente e o segundo mais comumente encontrado na amostra são somados para se obter uma soma ou score. Se o tumor apresentar apenas um padrão, este é duplicado para gerar o score. Os scores 2 e 3 são vistos muito raramente, porque o padrão 1 é pouco usual. O score 4 também é relativamente raro, pois é freqüente que o padrão 2 apareça combinado com o padrão 3, resultando em um score 5. Os scores de 2 a 4 podem ser vistos em lesões diagnosticadas por ressecção transuretral, método que amostra predominantemente a zona de transição onde mais freqüentemente encontram-se lesões de baixo grau.^{23,27} Em biópsias por agulha, há a recomendação de que não se utilizem estes scores (2 a 4).⁵⁰ Os scores 6 e 7 são os mais comuns e incluem a maioria dos scores na maioria dos estudos.

Tabela 6: Critérios Histológicos para a Gradação de Gleason ²⁷

Padrão	Descrição da morfologia*
1	Glândulas isoladas, separadas e uniformes, amontoadas. Lesão com bordas bem definidas
2	Glândulas isoladas, separadas e uniformes, menos amontoadas. Lesão com irregularidade nas bordas.
3A	Glândulas isoladas, separadas e uniformes, dispersas
3B	Glândulas isoladas, separadas e de tamanho muito pequeno, dispersas
3C	Massas papilares e cribriformes, circunscritas
4A	Glândulas fusionadas, acentuadamente infiltrativas
4B	Idêntico ao 4A, mas com células claras (hipernefróide)
5A	Grupamentos quase sólidos, massas arredondadas de células, necrose (“comedocarcinoma”)
5B	Anaplásico, acentuadamente infiltrativo

*Traduzida para a língua portuguesa.

Muitos estudos compararam biópsia e prostatectomia quanto ao escore.⁵¹⁻⁵³ Correlação exata foi observada em 28,2 a 67,9% dos casos. As biópsias foram subgraduadas em 24,5 a 60% dos casos e graduadas com escores maiores em 5,2 a 32,2%. Causas para as discrepâncias são problemas de amostragem, tumores com morfologia limítrofe entre os padrões e interpretação errada dos mesmos pelo patologista.²³ Felizmente, a concordância entre biópsia e prostatectomia, considerando-se uma tolerância de uma unidade do escore, ocorre em mais de 90% dos casos.⁵³

Diversos estudos já demonstraram que o escore de Gleason é um indicador de prognóstico muito útil em amostras de tecido prostático. Isto inclui a previsão da história natural dos carcinomas prostáticos bem como a predição do risco de recorrência após a prostatectomia radical ou radioterapia.^{23,26,27} Escores de 2 a 4 comportam-se de maneira semelhante e podem ser agrupados, assim como escores de 8 a 10. Há evidências de que o escore 7 é diferente em prognosticar os casos de carcinoma quando comparado com os grupos de escores 5-6 e 8-10.⁵⁴

1.2.5 DISSEMINAÇÃO TUMORAL E ESTADIAMENTO

A extensão extra-prostática local tipicamente ocorre na face anterior da glândula para os carcinomas da zona de transição e em localização póstero-lateral para os mais frequentes carcinomas da zona periférica.⁵⁵ Os carcinomas da zona periférica crescem para os tecidos periprostáticos através da invasão dos nervos³⁵ ou por infiltração direta da “cápsula”^{‡‡}. A extensão extra-prostática superior leva à infiltração do colo vesical, o que pode ocasionar obstrução urinária. A invasão das vesículas seminais pode ocorrer por invasão direta ou pelos ductos ejaculatórios. Metástases iniciam quando o carcinoma invade vasos sanguíneos ou linfáticos. Os locais mais comuns de metástases são os linfonodos regionais da pelve e os ossos do esqueleto axial. O sistema TNM (anexo 1) é o preferido atualmente para estadiamento clínico e patológico.²³

1.2.6 TRATAMENTO

1.2.6.1 CIRÚRGICO

A prostatectomia radical pode ser curativa em tumores confinados à glândula (estágios T1 e T2). Nesta cirurgia, a via de acesso preferida pelos urologistas é a

^{‡‡} A próstata não apresenta uma cápsula verdadeira²⁷, logo, uma melhor caracterização das lesões que se estendem além dos limites da glândula não é o termo extensão extra-capsular, mas sim, extensão extra-prostática. Como o tecido adiposo é muito infreqüente dentro da próstata, sendo encontrado em cerca de 0,66% dos casos²⁵, o mesmo serve como indicador de extensão extra-prostática de lesões malignas. O termo cápsula é bastante utilizado para se referir, macroscopicamente, ao tecido fibroso que se forma por compressão e que pode ser nítido separando as zonas descritas. Eventualmente a expressão cápsula será utilizada para manter a nomenclatura originalmente utilizada nos trabalhos citados.

retropúbica, com preservação dos feixes vasculonervosos para evitar a perda da potência sexual. Não havendo metástase, estaria indicada a cirurgia.²⁵

1.2.6.2 RADIOTERÁPICO

A radioterapia é uma alternativa à prostatectomia radical em casos confinados à próstata ou é terapêutica adjuvante quando há recidiva após prostatectomia radical.²⁵ Pode ser modalidade substitutiva da cirurgia em casos localmente avançados.²³

1.2.6.3 HORMONAL

É utilizado em casos de doença avançada, pois o carcinoma prostático reage favoravelmente à restrição de andrógenos e administração de estrógenos.²⁵ Este tratamento tem efeito paliativo. Pode ser feito na forma de castração, administração de estrógenos, administração de inibidores do hormônio liberador do LH ou de competidores pelos receptores de andrógenos.

1.2.6.4 CONSERVADOR

Há trabalhos mostrando que pacientes com carcinomas prostáticos em estágios T1 ou mesmo T2 e que não foram submetidos à prostatectomia tiveram sobrevida semelhante à da população da mesma idade sem carcinoma.²⁵ De acordo com Thompson⁵⁶, os melhores candidatos para este tipo de conduta seriam pacientes com mais de 70 anos de idade, com outros problemas médicos importantes como cardiopatia isquêmica, com tumores de baixo

grau, de volume pequeno ou diplóides. Na Europa e, principalmente, na Escandinávia, o tratamento conservador^{§§} tem ampla aceitação.⁵⁷

1.2.6.5 QUIMIOTERÁPICO

Ainda não existe esquema de quimioterapia eficaz para o tratamento do carcinoma prostático²⁵, embora existam algumas drogas consideradas promissoras em investigação.²⁷

1.2.7 FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS NO CARCINOMA PROSTÁTICO

O Colégio Americano de Patologistas classifica os fatores prognósticos e preditivos no carcinoma prostático em três categorias:^{23,58}

Categoria I: fatores de comprovadas importância e utilidade no manejo do paciente com a doença. Incluem o PSA pré-operatório, grau histológico (score de Gleason), estadiamento (TNM) e o estado dos limites cirúrgicos quando o paciente é submetido à prostatectomia radical.

Categoria II: fatores que foram extensamente estudados clínica e biologicamente e que necessitam de estudos epidemiológicos mais robustos para serem validados. Incluem estimativas do volume tumoral, tipo histológico do carcinoma e ploidia do DNA.

Categoria III: todos os outros fatores não suficientemente estudados para demonstrar seu valor no prognóstico. Incluem invasão de nervos, presença de diferenciação neuroendócrina, densidade de microvasos (angiogênese), características nucleares que não

^{§§} Conhecido, em inglês, como *watchful waiting*

incluem ploidia, marcadores de proliferação celular e toda a variedade de marcadores moleculares como oncogenes e anti-oncogenes.

A importância do PSA sérico e da graduação histológica de Gleason foram expostas previamente no item que trata do diagnóstico.

Da categoria III, alguns serão melhor detalhados a seguir por poderem ser relatados em biópsias, alguns sendo facilmente acessados no exame histológico rotineiro das mesmas, e/ou por serem importantes na parte experimental desta dissertação.

1.2.7.1 INVASÃO DE NERVOS

Acredita-se que a invasão neural seja via de disseminação extra-prostática do carcinoma prostático.⁵⁹ McNeal e colaboradores³⁵ demonstraram que 85% dos casos de penetração capsular estão relacionados com a invasão neural. A invasão neural pelo carcinoma da próstata não é um efeito somente de volume, pois carcinomas pequenos também podem apresentar invasão de nervo.⁶⁰ Yang e colaboradores⁶¹ relataram que o componente neural favorece o crescimento da neoplasia inibindo a apoptose, o que facilitaria a disseminação do carcinoma através dos nervos, mesmo em carcinomas considerados pequenos. O valor da identificação de invasão de nervos é controverso como fator preditivo independente em análises multivariadas^{58,62-65}, após consideração do grau de Gleason, PSA sérico pré-operatório e quantidade de tumor na biópsia.

1.2.7.2 MARCADORES MOLECULARES

Diversos estudos demonstram a expressão aumentada de determinados marcadores (*p53*, *bcl2*, *p21*, etc.) e baixa expressão de outros como *Rb*, e a sua relação com comportamento biológico mais agressivo nos carcinomas prostáticos, entretanto, confirmação destes achados é necessária antes que possam ser utilizados clinicamente.²³

Existem estudos conflitantes quanto à utilização das medidas de densidade de microvasos (angiogênese) e marcadores de proliferação (*ki67*), de diferenciação neuroendócrina (*cromogranina*), *p27*, *Her2/neu* (ou *c-erb-B2*), *E-Caderina* e *CD44*.²³

As mutações do *TP53* são consideradas um evento tardio⁶⁶ e tendem a ocorrer em casos avançados, sobretudo nos casos com metástases⁶⁷, entretanto, esta opinião não é unânime. Downing e colaboradores argumentam que as mutações do *TP53* também são freqüentes em carcinomas de estágios iniciais (cerca de um terço destes casos).¹⁸ Um estudo que avaliou espécimes de tumores primários e respectivas metástases encontrou a mutação do *TP53* com mais freqüência nas metástases, sugerindo que as metástases sejam expansões clonais de células com a mutação.¹¹

Avanços tecnológicos recentes sugerem que “assinaturas” moleculares podem auxiliar no diagnóstico, na determinação do prognóstico e para definir subtipos molecularmente estabelecidos da doença para estudos mais detalhados. Muitos dos trabalhos nesta área utilizam técnicas de microrrearranjos de DNA para caracterizar o perfil dos carcinomas prostáticos.²³

1.3 AVALIAÇÃO POR IMUNO-HISTOQUÍMICA DA SUPEREXPRESSÃO DA *p53* NO CARCINOMA PROSTÁTICO

O gene de supressão tumoral *TP53* está com frequência implicado em vários tipos de neoplasias humanas. A proteína *p53* anormal, resultante desta mutação, é muito mais estável podendo ser detectada por imuno-histoquímica utilizando-se anticorpos monoclonais. Em condições fisiológicas, a proteína *p53* tem uma meia vida curta, de cerca de 20 minutos. Quando mutante, a sua meia-vida é de 3 a 4 vezes maior que a proteína normal. Logo, para que a mutação do *TP53* possa ser estudada por imuno-histoquímica, é necessário que se estabeleça uma quantificação de positividade como ponto de corte para casos positivos que vise a eliminar a expressão normal da proteína como fator de confusão.⁶⁸

Anormalidades em outros genes relacionados às funções do *TP53* podem influenciar na expressão da proteína *p53*, resultando em superexpressão imuno-histoquímica sem a presença da mutação.¹⁹ Outra limitação da imuno-histoquímica neste tipo de avaliação é a ocorrência de certos tipos de mutação do *TP53* que resultam em expressão de proteína anômala sem o sítio antigênico reconhecido pelo anticorpo utilizado na técnica.¹⁹

Apesar destas limitações, a imunorreatividade para *p53* correlaciona-se bem com a mutação do gene nos casos de carcinoma prostático.^{69,70}

Existe grande variabilidade nos dados da literatura no que se refere à metodologia, sendo encontrados trabalhos que estudam a positividade para *p53* em material de biópsia^{7,19,71-73}, de ressecção trans-uretral¹⁰ e peças de prostatectomia radical^{5,9,12,74-77}, e alguns que analisam simultaneamente material de mais de um tipo de coleta diferente.^{8,78,79} Os estudos variam consideravelmente também quanto ao método de aferir a positividade para

p53, sendo encontrados alguns que consideram qualquer tipo de imunorreatividade como indicador da presença da mutação⁸, muitos que utilizam proporção de núcleos positivos dentro da amostra examinada, estabelecendo pontos de corte em determinada percentagem de células^{5,7,9,10,19,74,77-79}, e outros que utilizam escores complexos levando em consideração mais de um parâmetro para definir quais são os casos positivos.¹² O estudo de Yang e colaboradores⁸⁰ foi o primeiro a utilizar um padrão de categorização de imunorreatividade chamado de *em grupamento*^{***}, considerando um determinado número de núcleos corados em um campo microscópico de grande aumento. Este estudo mostrou 63% de recorrência pós-prostatectomia no grupo com imunorreatividade por este critério e 21% no grupo sem este tipo de expressão imuno-histoquímica ($p < 0,01$).

A maior parte dos trabalhos aponta a superexpressão imuno-histoquímica da *p53* como indicador de mau prognóstico no carcinoma prostático e como tendo relação com o escore de Gleason. Este último tem sido dividido, nestas publicações, em categorias como <7 e ≥ 7 ^{8,73,78,79}; 2-4, 5-7 e 8-10^{9,10,12,72,77}, e 2-4, 5-6, 7 e 8-10^{5,7}, ou sendo analisado através da média.⁷⁴

Os estudos divergem em apontar a superexpressão da *p53* como fator prognóstico independente^{5,10,12,77} ou não^{71,75,81} em modelos estatísticos multivariáveis, sendo incluída uma quantidade ampla e variável de outros fatores nestas análises, desde os consagrados PSA sérico^{5,12,71,74,76,77} e escore de Gleason^{5,9,10,12,71,74,76,77,78} até combinações de marcadores moleculares como os de proliferação celular^{10,77,79}, de apoptose⁷⁹, oncogenes^{10,77,79} e outros.⁶⁶

Shurbaji e colaboradores⁸, em 1995, estudaram a possível relação da proteína *p53* com a progressão do carcinoma prostático em 109 pacientes. Observaram que em casos de

*** A expressão, em inglês, *clustered p53 immunostaining* foi originalmente utilizada.

imunorreatividade negativa para *p53* houve 14% de progressão enquanto que a proporção foi de 30% nos casos positivos. Na análise multivariável, incluindo escore de Gleason e estadiamento, apenas o *p53* mostrou significância quando foram considerados os casos com escores entre 2 e 7. Também em 1995, Bauer e colaboradores ⁹, em análise multivariável (controlada para escore de Gleason, idade, raça e estágio), encontraram na imunorreatividade para *p53* um marcador prognóstico independente. Um estudo com 263 pacientes submetidos à prostatectomia radical publicado por Quinn e colaboradores ¹² mostrou que a positividade para *p53*, por IHQ, em peças de prostatectomia radical, correlacionou-se positivamente com recorrência da doença, sendo que todos os pacientes que morreram no seguimento médio de 55 meses foram positivos para o marcador. Em análise multivariável, que incluiu valor do PSA pré-operatório, estadiamento e escore de Gleason, o mesmo estudo apontou a superexpressão IHQ da *p53* como fator independente. Mostrou ainda, que todos os casos positivos para *p53* em mais de 2% das células (com contagem objetiva de 500 núcleos) também apresentaram positividade *em grupamento*. Esta última forma de imunorreatividade seria um bom parâmetro de positividade nos casos com menos de 2% de células marcadas, em peças de prostatectomia radical. Outro estudo com uma quantidade considerável de pacientes foi o de Leibovich e colaboradores ⁵ que acompanhou 392 com carcinoma prostático com doença localmente avançada submetidos à prostatectomia radical em média por 5,4 anos. Os casos com mais de 10% de núcleos positivos na amostra examinada correlacionaram-se positivamente com recidiva bioquímica e com recidiva clínica quando utilizada análise multivariável que incluiu medida da área de extensão extra-prostática, volume tumoral, escore de Gleason e valor do PSA. No estudo de Borre e colaboradores ¹⁰, 221 pacientes foram apenas acompanhados (tratamento conservador). A determinação da *p53* correlacionou-se independentemente com morte,

incluindo na análise multivariável a determinação do índice de proliferação celular (*ki67*) e expressão do *BCL-2*. O material estudado foi de ressecção trans-uretral.

Estudos com biópsias são mais conflitantes no que se refere à capacidade da imunorreatividade para *p53* de determinar prognóstico previamente ao tratamento. No estudo de Stackhouse ⁷, com 199 pacientes submetidos à prostatectomia, a imunohistoquímica para *p53* mostrou correlação com as recidivas quando estudada nas peças cirúrgicas, entretanto, no mesmo estudo, quando o marcador foi avaliado nas biópsias, não houve correlação estatisticamente significativa. Oxley e colaboradores ⁷¹, em seu estudo de 73 pacientes submetidos à prostatectomia radical, identificaram a positividade para *p53* como variável preditora de recorrência quando a determinação foi feita nas biópsias, mas, devido a baixa especificidade, questionam a sua utilização clínica. Grignon e colaboradores ¹⁹, em um estudo com materiais de biópsia e ressecção trans-uretral obtidos previamente a tratamentos com radioterapia e hormonioterapia, encontraram associação independente da determinação da *p53* (foram incluídos o escore de Gleason e estadiamento na análise) com presença de metástases, sobrevida livre de doença e sobrevida, indicando que os casos com mutação do *TP53*, por mecanismos de inibição da apoptose, têm piores resultados após tratamento radio e hormonioterápico.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A descoberta de marcadores moleculares relacionados às neoplasias faz com que se questionem quais destes eventos (moleculares) acontecem paralelamente às alterações morfológicas classicamente descritas como típicas dos tumores (que também geram as classificações histológicas), e se estes marcadores conseguem discriminar grupos prognósticos independentes das graduações usuais. A estreita correlação entre os achados de biologia molecular, como a mutação do *TP53* no carcinoma prostático, e os achados que representam as características histológicas desta neoplasia, incluindo os que são utilizados na graduação histológica, é importante para que se agregue base teórica a estes parâmetros. Deste modo, é possível auxiliar na identificação de quais destas características merecem estudos mais detalhados visando a posicioná-los como elementos importantes no conhecimento da biologia tumoral e/ou como possíveis fatores prognósticos ou preditivos.

3. OBJETIVOS DO ESTUDO

1. Identificar e quantificar possíveis associações da superexpressão da *p53* no carcinoma prostático com achados morfológicos em biópsias.

2. Identificar e quantificar possíveis associações da imunorreatividade para *p53* com a determinação imuno-histoquímica da invasão de nervos com a proteína S100 em biópsias.

3. Comparar, em biópsias da próstata com carcinoma, critérios de determinação de imunorreatividade da *p53*.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

O presente estudo avaliou amostras de tecido de 70 pacientes, submetidos a biópsia transretal da próstata, com carcinoma, em um período de seis meses, realizadas pelo Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Estes casos foram selecionados a partir de 500 exames consecutivos de biópsias por agulha, dos quais 101 (provenientes de 70 pacientes) ^{†††} apresentaram carcinoma da próstata. A técnica da biópsia, incluindo o número de fragmentos obtidos e locais biopsiados, variou de acordo com a indicação do médico que efetuou cada procedimento. Não foi definido pelo presente estudo um único médico que efetuaria as biópsias, nem uma padronização da técnica.

Os fragmentos biopsiados foram encaminhados e processados no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A técnica da imuno-histoquímica foi efetuada no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Todos os casos de biópsias por agulha da próstata do arquivo do Serviço de Patologia

^{†††} Como muitos pacientes tiveram suas amostras identificadas como de “lobo direito” e “lobo esquerdo”, o número de exames anatomopatológicos gerados foi superior ao número de pacientes biopsiados (respectivamente, 101 e 70, referentes aos exames anatomopatológicos e pacientes com diagnóstico de carcinoma). Não foi examinado material de mais de uma amostragem do mesmo paciente em momentos diferentes.

do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de 26 de abril de 2000 a 15 de setembro do mesmo ano.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Casos de biópsias por agulha da próstata sem carcinoma.
- Casos de biópsias por agulha da próstata “suspeitos, mas não diagnósticos de carcinoma”.
- Casos diagnosticados como carcinoma no exame histológico pela coloração HE, que apresentaram perda de tecido nos novos cortes realizados para a técnica de imuno-histoquímica em quantidade suficiente para que o tumor não fosse identificado morfológicamente nestes novos cortes.

4.4 PARÂMETROS CLÍNICOS

Foram analisados, após consulta do prontuário médico dos pacientes, parâmetros prévios à biópsia, como idade do paciente e PSA sérico total.

4.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo transversal contemporâneo.

4.6 PREPARAÇÃO DO MATERIAL

Todas as biópsias foram fixadas em formalina tamponada a 10%, processadas (desidratação em álcool etílico de concentrações crescentes, clareamento em xilol, impregnação por parafina fundida) e incluídas em blocos de parafina. Os blocos de parafina contendo os tecidos incluídos foram seccionados pela navalha de aço do micrótomo, obtendo-se cortes com cerca de 5 μm (5 micrômetros = 0,005 milímetros) de espessura. As lâminas preparadas foram coradas pelo método da hematoxilina e eosina. Numa segunda etapa, os mesmos blocos de parafina foram novamente seccionados no micrótomo, obtendo-se novos cortes com cerca de 5 μm de espessura. Estes foram corados pela técnica de imuno-histoquímica (complexo streptavidina-biotina-peroxidase), utilizando o anticorpo para a proteína *p53* (Dako®, *mouse anti-human*, monoclonal, clone DO-7, diluição: 1:100) que reconhece tanto as formas mutantes quanto a forma normal ou “selvagem”^{***} da proteína *p53* (ver Anexo 2). Cortes de tecido de tumores mamários reconhecidamente positivos para a reação serviram de controle positivo para toda a bateria de testes.

4.7 INSTRUMENTOS DE AFERIÇÃO

4.7.1 Microscópio Óptico (MO)

^{***} Do inglês: *wild type*.



Fig.4: Microscópio óptico de dupla observação, da marca Zeiss modelo Standard 20 com quatro objetivas (2,5, 20, 40 e 100 aumentos) e ocular com aumento de dez vezes. Diâmetro do campo de microscopia com objetiva de 400 = 0,4 mm.

4.7.2 Régua Milimetrada

Régua milimetrada transparente de 30,0 centímetros.

4.7.3 Retículo de Medida Ocular (RMO)

Instrumento que substitui uma das oculares do microscópio. Apresenta ocular própria com aumento de 12,5x. Está subdividido em 12 unidades padrão. Estas unidades foram transformadas em milímetros com o auxílio da régua microscópica (ver item 4.7.4). Em

cada objetiva verificou-se quanto, em milímetros, dez unidades representavam. Esta aferição foi repetida três vezes. Com estes valores e efetuando-se a regra de três, foi montada uma tabela de 0 a 10 unidades nas quatro objetivas (Anexo 4).



Fig.5: Microscópio óptico de dupla observação com o retículo de medida inserido em uma das oculares (círculo).

O uso do retículo de medida ocular permitiu uma medida mais precisa da estimativa da espessura dos fragmentos.

Exemplo:

Objetiva\Unidades	2,5x	10x	20x	40x
10 U	1,1818	0,333	0,1666	0,0833

Para objetiva de 10x:

Se	10 U ----- 0,333 mm
	5 U ----- x
	$x = 0,1666 \text{ mm}$

4.7.4 Régua Microscópica

Régua milimetrada transparente de 2,0 centímetros.

4.8 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Todas as biópsias foram avaliadas simultaneamente por dois patologistas^{§§§}, em um microscópio óptico de dupla observação e as discordâncias resolvidas por consenso.

O escore de Gleason foi padronizado de acordo com a descrição original de Donald F. Gleason²⁷, com auxílio de orientações de como proceder na graduação de biópsias²⁶ (Anexo 3).

Inicialmente foram estudadas todas as biópsias coradas pelo HE e, numa segunda etapa, com intervalo mínimo de seis meses, foram observadas todas as biópsias coradas pela imuno-histoquímica para a proteína S-100 e para *p53* (tabela 7).

^{§§§} Isnard Elman Litvin e Guilherme Portela Coelho.

Tabela 7: Etapas do trabalho ****

	Etapas do Trabalho	Instrumento de Aferição
1	Confirmar a presença de adenocarcinoma	MO
2	Contar o número de fragmentos na lâmina	MO
3	Efetuar graduação histológica de Gleason	MO
4	Identificar os aspectos morfológicos da lesão	MO
5	Determinar subjetivamente a quantidade (percentual) de carcinoma no total de tecido de cada caso	MO
6	Medir a extensão (comprimento) dos fragmentos (ExF)	Régua milimetrada
7	Medir a largura (estimativa da espessura) do maior fragmento (EsF)	MO + RMO
8	Medir a extensão (comprimento) do tumor (ExCa)	MO + Régua microscópica
9	Medir a maior largura (estimativa de espessura) do fragmento com carcinoma (EsCa)	MO + RMO
10	Avaliar a positividade nuclear para <i>p53</i> e descrever o seu padrão	MO

MO: microscópio óptico; RMO: retículo de medida ocular; ExF: medida em milímetros da extensão do fragmento; EsF: medida em unidades da espessura do maior fragmento; ExCa: medida em milímetros da extensão do carcinoma nos fragmentos acometidos; EsCa: medida em unidades da maior espessura do fragmento com carcinoma.

4.8.1 Medida da Área dos Fragmentos (AF)

A extensão (comprimento) dos fragmentos foi medida a olho nu com a régua milimetrada, colocada sobre a lâmina de vidro. A largura (estimativa de espessura) do maior fragmento foi obtida em unidades padrão do RMO. Após transformar as unidades em milímetros, somaram-se todas as extensões dos fragmentos e multiplicou-se o resultado pela espessura, como se fosse um retângulo (base x altura).

**** Ver anexo 4 para metodologia da avaliação de nervos pela coloração IHQ para S100.

Exemplo:

$$\mathbf{AF = (ExF_1 + ExF_2 + ExF_3...) X EsF}$$

AF, área dos fragmentos em mm²

ExF, medida em milímetros da extensão (comprimento) do fragmento.

EsF, medida em unidades da largura (estimativa de espessura) do maior fragmento.

Antes do cálculo as unidades foram transformadas em milímetros.

4.8.2 Medida da Área de Carcinoma (AC)

A extensão (comprimento) do carcinoma da próstata foi medida sob microscopia óptica com a régua milimetrada, colocada sobre a lâmina de vidro, entre esta e a objetiva. A maior largura (estimativa de espessura) do carcinoma entre todos os fragmentos envolvidos por tumor foi obtida em unidades padrão do RMO. Após transformarem-se as unidades em milímetros, somaram-se todos os focos de carcinoma e multiplicou-se o resultado pela largura (estimativa de espessura), como se fosse um retângulo (base x altura).

Exemplo:

$$\mathbf{AC = (ExCa_1 + ExCa_2 + ExCa_3...) X EsCa}$$

AC, área de carcinoma em mm²

ExCa, medida em milímetros do comprimento do carcinoma nos fragmentos acometidos.

EsCa, medida em unidades da maior largura (estimativa de espessura) de carcinoma.

Antes do cálculo as unidades foram transformadas em milímetros.

4.8.3 Proporção Objetiva de Carcinoma (POC)

A proporção de carcinoma do paciente foi obtida dividindo-se a área total de carcinoma pela área total de fragmentos nos cortes histológicos.

Exemplo:

$$\text{POC} = \text{AC} / \text{AF}$$

POC, proporção de carcinoma em %.

AC, área de carcinoma em mm²

AF, área dos fragmentos em mm²

4.9 AFERIÇÃO DA POSITIVIDADE PARA *p53* POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram inicialmente considerados como positivos para a reação imuno-histoquímica, todos os casos com marcação nuclear no tumor, em qualquer quantidade e intensidade, desde que esta marcação não fosse interpretada como defeito técnico, sendo para isto utilizados como auxiliares os exames de controle mencionados no item 4.6. Este tipo de marcação foi identificada como “*p53*”. Dos casos positivos para “*p53*”, foram ainda coletadas informações referentes à quantidade de núcleos positivos dentre o total de núcleos de carcinoma, na forma de percentagem, avaliada subjetivamente e identificada como “*p53prop*”, podendo variar teoricamente entre 0 (zero)% e 100%, e intensidade da reação (“*p53int*”), em escore de 0 (zero) a 3, sendo assinalado o valor 3 para os casos com núcleos corados com maior intensidade e 0 (zero) para os casos sem marcação (ou negativos). A avaliação da intensidade também utilizou os controles como parâmetro. Nos casos onde foram encontrados, em um mesmo campo microscópico de 400x, 15 ou mais núcleos positivos, em qualquer intensidade, foi utilizada a designação de positividade para *p53 em grupamento* (“*p53g*”), conforme estudo de Yang e colaboradores.⁸⁰

4.10 BASE DE DADOS

Foi utilizado, como banco de dados, o *software* Access® para Windows® XP da Microsoft®. Os dados obtidos pela técnica de imuno-histoquímica para proteína S100 são provenientes do trabalho da dissertação de mestrado de Litvin, I.E.⁶⁰ (ver anexo 4). Tanto estes, quanto os dados do presente estudo, encontram-se no mesmo banco de dados já mencionado e foram coletados pelos mesmos patologistas já citados no primeiro parágrafo do item 4.8.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados quantitativos foram descritos como média e desvio padrão. Na presença de assimetria utilizaram-se a mediana e a amplitude interquartil. Nas variáveis categóricas, foram utilizadas a frequência e o percentual.

A comparação entre as modalidades de aferição da positividade imuno-histoquímica para *p53* e os achados histológicos, PSA sérico e idade dos pacientes foi efetuada através da obtenção do coeficiente de correlação de Spearman. Quando comparadas duas variáveis nominais dicotômicas, foi utilizado também o coeficiente *phi*. O teste de significância, nas variáveis medidas em escala ordinal, foi feito através da aferição da significância da correlação de Spearman (r_s), que é feita através do teste “t” de Student, pois a amostra é considerada grande^{††††} e a estatística gerada por este coeficiente, nestas situações, se

^{††††} Estatisticamente, para este fim, são consideradas grandes as amostras maiores que 20.⁸²

comporta de maneira adequada para a utilização deste teste. A significância do coeficiente *phi* é calculada a partir do teste do qui-quadrado de Pearson. Um valor de $\alpha \leq 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. Para qualificar a magnitude das associações, utilizaram-se tabelas que agrupam os valores obtidos em categorias que variam desde associações ausentes até perfeitas (anexo 5).

4.11.1 Programa Estatístico

SPSS (*Statistical Package for Social Science* versão 11.0 - Chicago, IL).

4.12 ASPECTOS BIOÉTCOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA), tendo sido aprovado. Considerando-se que o estudo não interferiria no tratamento e prognóstico destes pacientes, não foi necessária a apresentação do termo de consentimento informado aos pacientes.

4.13 FINANCIAMENTO

O estudo foi parcialmente financiado pelo FIPE / HCPA.

5. RESULTADOS

Este estudo avaliou amostras de tecido prostático em 101 procedimentos consecutivos de biópsias transretais com carcinoma da próstata, de 70 pacientes. A maioria dos pacientes (85,7%) tinha idade acima de 60 anos. Em 44, 28% dos pacientes, o nível sérico do PSA total estava entre 4,0 a 10,0 ng/ml. Dos 70 pacientes, 29 (41,4%) tinham escore 7 de Gleason. Foi excluído um caso devido à falta de carcinoma no corte histológico onde foi realizada a técnica de imuno-histoquímica para *p53*. As tabelas 8 e 9 descrevem as características clínicas e histopatológicas dos pacientes estudados.

Tabela 8: Características descritivas dos pacientes com carcinoma de próstata (n=69)

Característica	Medida de sumário
Idade, anos	69,1±9,0
PSA sérico total, ng/ml	8,8 (6,4 – 20,1)
Escore de Gleason	6,6±0,7
Proporção de Carcinoma no total de tecido amostrado, %	27,3 (6,1 – 51,3)
Medida do maior eixo de tumor, mm	5,9 (2,5 – 10,0)

Os dados são apresentados como média±desvio padrão ou mediana (amplitude interquartil: P25 – P75). PSA: antígeno prostático específico

Dos 69 pacientes estudados, 47,8% apresentaram positividade para *p53* e 26,1% foram positivos para o mesmo marcador quando foi utilizado o critério de positividade *em grupamento* (fig. 6). Quando, além da positividade para *p53*, foi avaliada a proporção de

Tabela 9: Distribuição dos pacientes segundo níveis de risco para recidiva bioquímica no carcinoma de próstata (n=69)⁸⁴

Nível de risco	f	%
Baixo: PSA \leq 10 e Gleason \leq 6	25	36,2
Intermediário: PSA 10 a 20 ou Gleason = 7	35	50,7
Alto: PSA $>$ 20 ou Gleason \geq 8	9	13,1

PSA: antígeno prostático específico (ng/ml)

núcleos positivos para *p53*, os casos variaram entre nenhum núcleo positivo (0%) e 60% de núcleos positivos. Quanto à intensidade da positividade, os casos estudados obtiveram valores de zero a 3 (fig. 7, 8 e 9) A tabela 10 mostra as características descritivas das técnicas utilizadas para aferir a positividade imuno-histoquímica para *p53*.

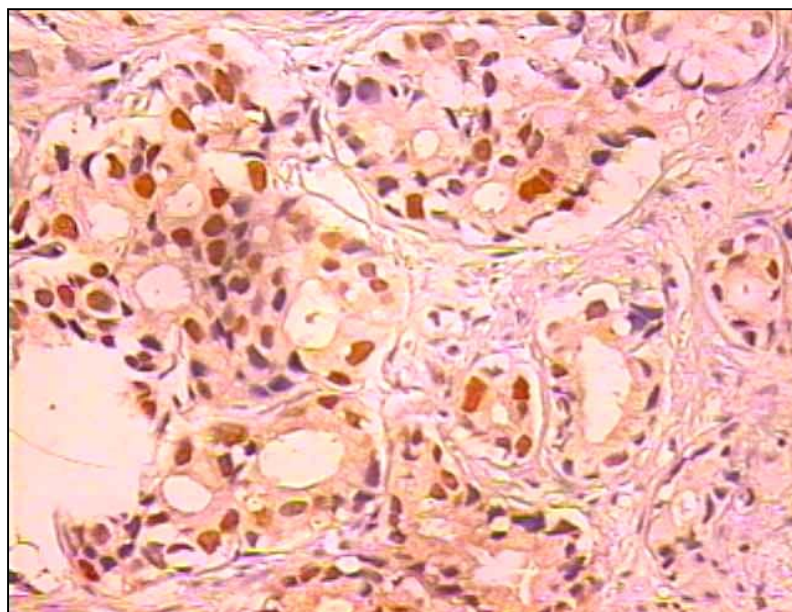


Fig. 6: Positividade *em grupamento* (15 ou mais núcleos corados – marrom – em campo de 400x) para *p53*.

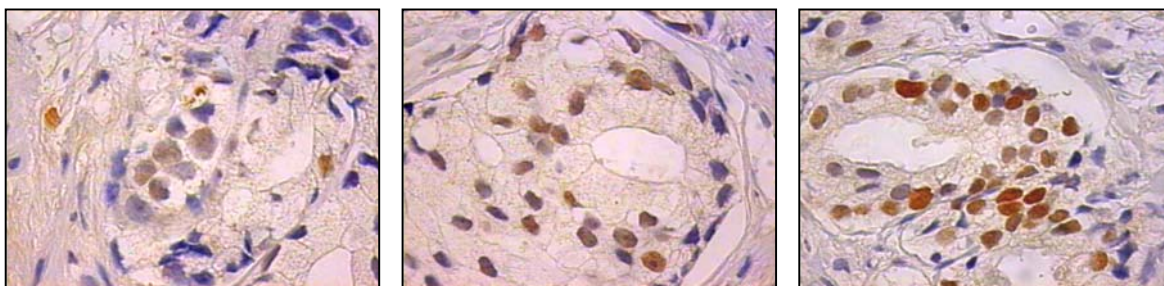


Fig. 7: *p53*+, intensidade 1.

Fig. 8: *p53*+, intensidade 2.

Fig. 9: *p53*+, intensidade 3.

Tabela 10: Características descritivas das modalidades de aferição da imunorreatividade para *p53* (n=69)

Modalidade de aferição da imunorreatividade para <i>p53</i>	Medida de Sumário
<i>p53 em grupamento</i>	26,1%
<i>p53</i>	47,8%
<i>p53, intensidade da reação</i>	0 (0 – 1)
<i>p53, percentagem de núcleos positivos</i>	0 (0,0 – 7,5)

Os dados são apresentados como percentual de casos positivos na amostra ou mediana (amplitude interquartil: P25 – P75).

Intensidade da positividade para *p53*: 0=negativo, 1=positivo em intensidade fraca, 2=positivo em intensidade intermediária, 3=positivo em intensidade forte.

Dos 69 casos avaliados, 89,9% obtiveram escores de Gleason 6 ou 7. A tabela 11 mostra a distribuição dos escores de Gleason nos pacientes nos quais foi estudada a expressão da *p53*.

Tabela 11: Distribuição dos Escores de Gleason dos pacientes com carcinoma (n=69)

	Escore de Gleason				Total
	6	7	8	9	
n	32	30	6	1	69
%	46,4	43,5	8,7	1,4	100

Entre as modalidades de determinação da imunorreatividade para *p53*, a positividade *em grupamento* (*p53g*) apresentou os maiores valores de coeficiente de correlação (correlação positiva) quando testada frente ao valor do PSA e a características histológicas freqüentemente estudadas como fatores prognósticos e/ou preditivos no carcinoma prostático. Estes dados são apresentados na tabela 12. As correlações variaram entre muito fracas e moderadas, conforme padronização para coeficientes de correlação (anexo 5).

Tabela 12: Coeficiente de Correlação entre os métodos de aferição da imunorreatividade para *p53* e achados clínicos e histológicos dos pacientes com carcinoma prostático

Método de Aferição	Características					
	Clínicas n=68		Histológicas n=69			
	Idade	PSA	POC	>Eixo de tumor	IN (HE)	Gleason
<i>p53prop</i>	0,13 (0,29)	0,18 (0,14)	0,13 (0,30)	0,20 (0,10)	-0,11 (0,35)	0,18 (0,14)
<i>p53int</i>	0,07 (0,54)	0,11 (0,39)	0,15 (0,21)	0,18 (0,13)	-0,17 (0,16)	0,17 (0,15)
<i>p53</i>	0,03 (0,80)	0,18 (0,19)	0,18 (0,15)	0,19 (0,11)	-0,13 (0,27)	0,13 (0,28)
<i>p53g</i>	0,04 (0,76)	0,23 (0,06)	0,20 (0,09)	0,34 (<0,01)	0,11 (0,37)	0,23 (0,06)

Os dados estão apresentados como Coeficiente r_s de Spearman (valor p). Ver anexo 5 – magnitude das associações.

PSA: antígeno prostático específico. *p53prop*: proporção(%) de células positivas. *p53int*: intensidade da positividade. *p53*: positividade em qualquer padrão. *p53g*: positividade *em grupamento*. POC: proporção(%) objetiva de carcinoma. > Eixo de tumor: maior eixo de tumor na amostra. IN: invasão de nervo. HE: método da hematoxilina e eosina. Gleason: escore de Gleason.

Quando estudada a relação entre presença de invasão de nervos (fig. 10) e a positividade *em grupamento* para *p53*, encontrou-se associação tênue, sem significância estatística, quando a invasão de nervo(s) foi aferida pelo exame histológico convencional (HE). Utilizada a determinação de invasão de nervo(s) com o auxílio da reatividade para a proteína S100 por imuno-histoquímica (fig. 11 e 12), houve significância estatística e um

aumento da faixa de magnitude no coeficiente ϕ (0,33; $p < 0,01$). Dos casos com invasão de nervo detectada no HE, 14,5% apresentaram positividade *em grupamento* para $p53$, contrastando com 23,2% de positividade para $p53$ *em grupamento* nos casos com invasão de nervos detectada com a utilização da demonstração imuno-histoquímica da proteína S100 (tabela 13).



Fig. 10: Invasão de nervo por carcinoma (HE, 400x).

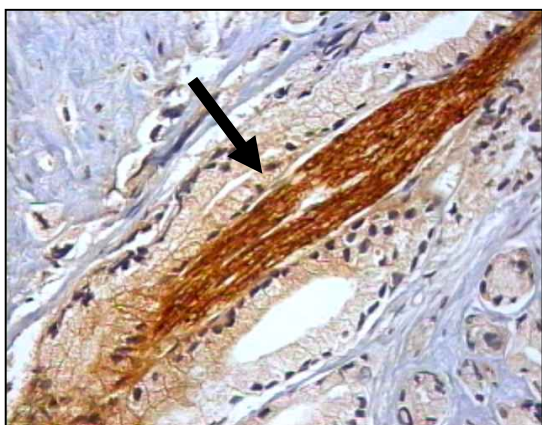


Fig. 11: Invasão de nervo por carcinoma (S100, 400x).

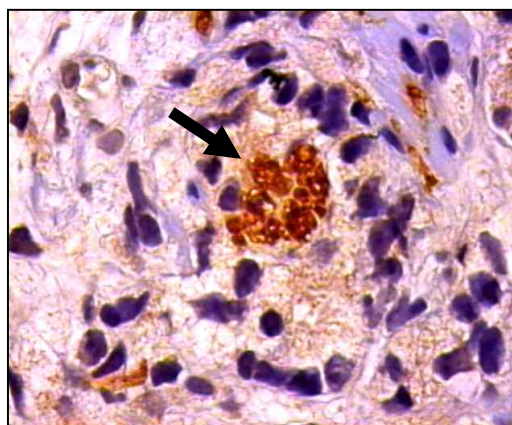


Fig. 12: Invasão de nervo por carcinoma (S100, 1000x).

Tabela 13: Coeficiente de concordância (*phi*) entre a imunorreatividade *em grupamento* para *p53* e presença de invasão neural por carcinoma prostático nos métodos HE e de imuno-histoquímica para a proteína S100. n=69

	n (%)	Presença de <i>p53</i> <i>em grupamento</i>	<i>phi</i> *†	p*
Invasão de nervo - HE	32 (46,4)	10 (14,5)	0,11	0,36
Invasão de nervo - S100	43 (62,3)	16 (23,2)	0,33	<0,01

Os valores da coluna *p53 em grupamento* são apresentados como número de casos com presença concomitante da positividade para *p53 em grupamento* e presença de invasão de nervo (%). †Ver anexo 5– magnitude das associações.

Em relação aos critérios morfológicos utilizados para o diagnóstico de carcinoma prostático, encontraram-se associações estatisticamente significativas entre a positividade *em grupamento* para *p53* e a presença de fibroplasia mucinosa (micronódulos de colágeno) (fig. 13) e presença de mais de um nucléolo proeminente em um mesmo núcleo (fig. 14) das células de carcinoma ($p < 0,01$). Os dados relativos aos critérios morfológicos estão apresentados nas tabelas 14 e 15.

Tabela 14: Frequência de critérios diagnósticos nos carcinomas prostáticos (n=69) e relação com a imunorreatividade *em grupamento* para *p53*. Parte I.

Crítérios	Frequência relativa -%	<i>p53 em grupamento</i> n (%)	<i>phi</i> *†	p*
Nucleares				
Nucléolos Proeminentes	97,1	18(26,1)	0,10	0,40
Mais de um (1) Nucléolo Proeminente em um Núcleo	55,1	16(23,2)	0,40	<0,01
Aumento do Tamanho Nuclear (n=67)†	73,1	13(19,4)	0,04	0,72
Hipercromasia Nuclear (n=67)†	58,2	12(17,9)	0,15	0,23

continua...

continuação...

Critérios	Frequência relativa -%	p53 em grupamento n (%)	phi *†	p*
Citoplasmáticos				
Anfofilia	53,6	11(15,9)	0,09	0,46
Citoplasma Amplo‡	28,4	7(10,4)	0,17	0,17
Secreção Intraluminal				
Eosinofílica				
Grumosa	91,3	16(23,2)	-0,05	0,67
Concêntrica	18,8	4(5,8)	0,05	0,67
Sem outra especificação	8,7	3(4,3)	0,17	0,16
Cristalóides	31,9	7(10,1)	0,09	0,46
Basofílica				
Mucínosa	72,5	15(21,7)	0,14	0,23

Os valores da coluna *p53 em grupamento* são apresentados como número de casos com presença concomitante da positividade para *p53 em grupamento* e o achado morfológico – critério – indicado na primeira coluna(%).

‡Foram excluídos casos onde não houve célula epitelial benigna na amostra para comparação.

Phi: medida de associação para duas variáveis dicotômicas. †Ver anexo 5 – magnitude das associações.

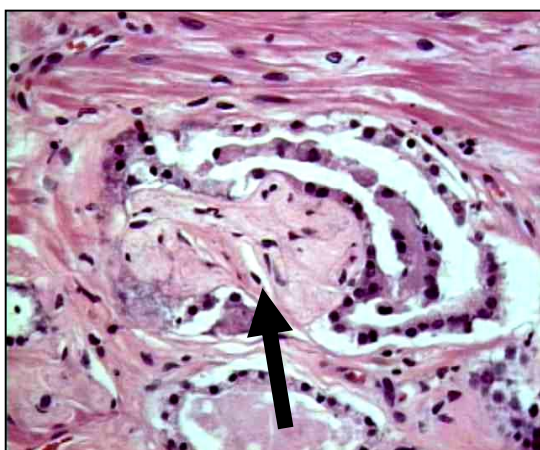


Fig. 13: Fibroplasia mucinosa (micronódulos de colágeno) (HE 400x).

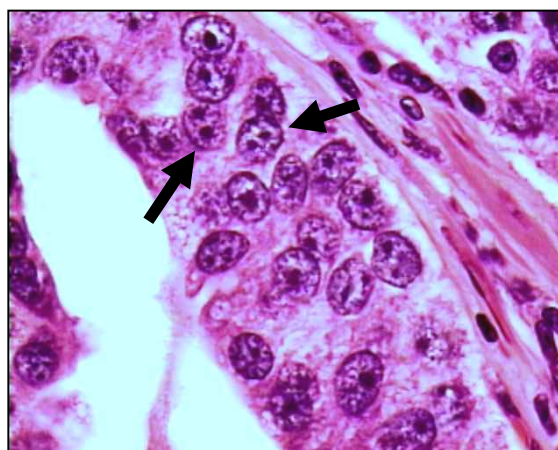


Fig. 14: Mais de um nucléolo proeminente por núcleo de célula de carcinoma (HE 1000x).

Tabela 15: Frequência de critérios diagnósticos nos carcinomas prostáticos (n=69) e relação com a imunorreatividade *em grupamento* para *p53* – Parte II.

Crítérios	Frequência relativa (%)	<i>p53 em grupamento</i> n (%)	<i>phi</i>**†	p*
Arquiteturais e Estromais ^a				
Glândulas orientadas em eixos perpendiculares entre si	88,4	15(83,3)	-0,09	0,43
Ácinos pequenos e regulares em meio a ácinos normais	84,1	16(23,2)	0,08	0,51
Desmoplasia	21,7	6(8,7)	0,17	0,16
Outros				
Figura(s) de mitose	4,3	2(2,9)	0,20	0,10
Fibroplasia Mucinosas [¶]	7,2	4(5,8)	0,34	<0,01
Extensão Extra-Prostática [¶]	5,8	1(1,4)	0,00	0,96
Formações Glomerulóides	18,8	5(27,8)	0,14	0,26
NIP de Alto Grau associada	31,9	8(11,6)	0,16	0,18

Os valores da coluna *p53 em grupamento* são apresentados como número(%) de casos com presença concomitante da positividade para *p53 em grupamento* e o achado morfológico – critério – indicado na primeira coluna.

^a Exceto invasão de nervos.

[¶] Micronódulos de colágeno.

[¶] Identificada através do achado de infiltração de tecido adiposo.

Phi: medida de associação para duas variáveis dicotômicas. †Ver anexo 5 – magnitude das associações.

NIP: neoplasia intraepitelial prostática.

6. DISCUSSÃO

A determinação imuno-histoquímica da superexpressão da *p53* associa-se a mau prognóstico em carcinomas prostáticos. Tem sido associada com o escore de Gleason, principalmente quando os escores são agrupados em categorias (p.ex.: 2-4, 5-7 e 8-10 ou <7 versus ≥ 7), com o valor do PSA sérico, com doença metastática, com recorrência da doença pós-prostatectomia e com má resposta a tratamento radioterápico em muitos estudos.

A presença da superexpressão imuno-histoquímica para *p53* é mais freqüente em carcinomas originados na zona periférica do que nos da zona de transição. Estes últimos costumam apresentar escores de Gleason mais baixos serem menos agressivos.⁸³

No nosso estudo, encontramos 47,8% de positividade para *p53* sem outras especificações e 26% de positividade *em grupamento* para o mesmo marcador. A literatura apresenta freqüências entre 6%, nos carcinomas de baixo grau⁷⁹, e 80%, quando qualquer quantidade de positividade é encontrada em peças cirúrgicas⁷⁴, sendo evidente uma grande variabilidade dependente de tipo de material examinado e método de aferição de positividade para a mutação. Em biópsias, encontramos na literatura freqüências entre 18% e 66%.^{19,71}

A determinação *em grupamento* da expressão imuno-histoquímica da *p53* mostrou-se, no presente estudo, superior às demais formas de categorizar como positiva a imunorreatividade para o produto do gene. Mesmo com uma magnitude não muito superior, relacionou-se com mais força com o valor do PSA e com os achados freqüentemente mencionados nos laudos anatomopatológicos que têm valor preditivo, independente ou não,

para eventos adversos no seguimento dos pacientes com carcinoma prostático. Houve significância estatística da correlação com o maior eixo de tumor nas amostras ($p < 0,01$) e uma tendência à significância estatística quando estudados o escore de Gleason ($p = 0,06$) e o valor do PSA sérico ($p = 0,06$).

Pelos resultados deste estudo, pela não alteração nos custos do exame e por não haver aumento significativo no tempo e na dificuldade relacionados especificamente com este tipo de aferição quando comparado aos outros métodos testados, não hesitamos em recomendá-lo como um dos métodos de escolha em biópsias. Estes achados estão em concordância com os de Yang e colaboradores⁸⁰ que, de forma pioneira, sugerem esta modalidade para o estudo imuno-histoquímico desta mutação no câncer de próstata. Uma explicação para esta provável especificidade maior para identificar a mutação reside no fato de que é muito pouco provável que a expressão de uma proteína, que em situações normais tem uma meia vida curta, seja detectada simultaneamente em 15 núcleos dentro de um mesmo campo de grande aumento de microscopia (400x).

O estadiamento pré-operatório do carcinoma da próstata é baseado no toque retal, no PSA sérico, nos achados histopatológicos da biópsia e em exames de imagem. O toque retal, freqüentemente, subestima a extensão do tumor, e os exames de imagem acrescentam pouco para a acurácia do estadiamento pré-operatório. A interpretação pré-operatória do PSA sérico é confundida pela hiperplasia nodular da próstata e pelo grau de diferenciação do tumor⁸⁴. Portanto o PSA sérico não é suficientemente adequado para predizer estadiamento patológico final em um indivíduo com doença localizada. O escore de Gleason na biópsia é fortemente associado com estadiamento patológico final para pacientes que apresentam escores extremos (escores de 2 a 4 e de 8 a 10)⁵⁸. Entretanto,

grande parte dos pacientes com carcinoma da próstata apresenta escores de Gleason 6 e 7, valores que não são bons preditores de estadiamento patológico. Na nossa amostra, de 69 pacientes, 89,9% apresentaram escores de Gleason 6 e 7.

Com relação ao *TP53*, há virtualmente um consenso ao afirmar que o funcionamento defeituoso do mesmo, que pode ser expresso na demonstração imuno-histoquímica da superexpressão da proteína *p53*, correlaciona-se com perfil mais agressivo da doença. A controvérsia é se a determinação da mutação por imuno-histoquímica tem poder preditivo independente, principalmente se examinada em biópsias, quando comparada a fatores prognósticos clássicos como, por exemplo, o escore de Gleason e valor do PSA sérico. Novos estudos, incluindo também outros métodos de estudo do gene, ainda são necessários. A falta de uma padronização que seja universalmente utilizada para o ponto de corte na quantificação de núcleos positivos que representaria melhor a presença da mutação ou que indique os casos de pior prognóstico pode ser em parte responsável pela controvérsia. Em algumas situações específicas, como a que se refere ao tratamento radioterápico, parece haver uma possibilidade mais forte de utilização clínica, uma vez que casos com a mutação responderiam menos ao efeito pró-apoptose deste tratamento.¹⁹⁻²¹

A invasão neural pelo carcinoma da próstata na biópsia, como preditor para estadiamento tumoral, tem sido examinada por vários estudos. Entretanto, o valor preditivo positivo encontrado é muito variado. A frequência de invasão neural varia nos estudos entre 11 e 38%, logo não é surpreendente que existirão diferenças entre os mesmos quanto à especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.⁶⁰ A invasão neural é um critério diagnóstico de carcinoma prostático e pode ter valor preditivo nesta doença. A técnica da imuno-histoquímica com S-100 permite a detecção de nervos

invasões de menor diâmetro, os quais dificilmente são detectados nas lâminas coradas pelo HE. O estudo de Litvin e colaboradores⁶⁰, com amostragem de tecido de 70 pacientes, comparou, em punção-biópsia da próstata com carcinoma, as técnicas da HE com a imuno-histoquímica da proteína S-100, método mais sensível para identificar nervos.

O presente estudo utilizou os mesmos casos do estudo de Litvin, exceto por um, que foi excluído devido ao desaparecimento do carcinoma prostático no corte histológico destinado à realização da técnica de imuno-histoquímica para *p53*. Esta perda deve-se ao fato de que, com o aprofundamento do nível de secção do bloco de parafina para se obter mais um corte histológico, foi obtida uma amostra de tecido (novo corte) sem neoplasia. Este evento não é infrequente na rotina diagnóstica da anatomia patológica.

Litvin, nos 70 pacientes avaliados, encontrou 31 (44,3%) pacientes com invasão de nervo pelo carcinoma no HE e 43 (61,4%) com invasão de nervo com a técnica imuno-histoquímica para a proteína S-100 ($p < 0,001$). Estes achados são expressivos, pois diferem consideravelmente das informações encontradas na literatura. Esta diferença estatisticamente significativa manteve-se na amostra do presente estudo (com um paciente a menos), que para os mesmos achados, apresentou frequências semelhantes (respectivamente 46,4% *versus* 62,3%).

A associação do achado de positividade imuno-histoquímica *em grupamento* para *p53* com a invasão de nervos, quando esta é identificada com o auxílio da imuno-histoquímica para a proteína S100, contrasta com a associação fraca, sem significância estatística, quando a presença de invasão de nervos é determinada pelo exame histológico convencional (HE).

Como, de acordo com o estudo de Litvin, os nervos invadidos que são detectados apenas na técnica da S100 são os de menor tamanho, pode-se concluir que a invasão destes nervos de menor tamanho é responsável pelas diferenças encontradas quando a comparamos (técnica da S100) com o HE, no que se refere à imunorreatividade para *p53*, ou seja, quando há invasão de nervos pequenos que normalmente passam despercebidos na histologia convencional, há uma maior chance de estarmos frente a um caso com positividade imuno-histoquímica para a proteína *p53* e a uma provável mutação do gene *TP53*.

O mecanismo classicamente proposto para a invasão de nervos por carcinoma é que, nos trajetos de nervos, existe uma condição de menor pressão^{6,59,85,86}, logo, os carcinomas teriam uma via de crescimento e disseminação facilitada. É possível que, nos nervos pequenos, a infiltração por carcinoma não seja facilitada da mesma maneira por este mecanismo.

Algumas evidências apontam que invasão neural pelo carcinoma da próstata não parece ser um efeito somente de volume tumoral e pressão reduzida no trajeto de nervos, pois carcinomas pequenos também podem apresentar invasão de nervo. Yang e colaboradores⁶¹ relataram que o componente neural favorece o crescimento da neoplasia inibindo a apoptose, o que facilitaria a disseminação do carcinoma através dos nervos, mesmo em carcinomas considerados pequenos.

Como o *TP53* normal tem múltiplas funções conhecidas na proteção ao desenvolvimento de tumores e na progressão destes, é possível que os subclones onde exista mutação deste no carcinoma prostático obtenham favorecimento para o

desenvolvimento de outras mutações, entre estas, alguma(s) que favoreça(m) maior potencial de infiltração da neoplasia, permitindo a invasão de nervos por mecanismo(s) diverso(s) da facilidade concedida por ambiente de menor pressão presente no trajeto dos mesmos. Além disto, um dos mecanismos de inibição da apoptose em tumores é a disfunção do *TP53*.

Estes achados estimulam o estudo da invasão de nervos como fator prognóstico/preditivo no nosso meio, devido à sua alta frequência nos casos estudados tanto com a histologia convencional (HE), quanto no exame com a proteína S100, onde a frequência é ainda maior e são encontrados nervos de menor tamanho. Reforçam também o estímulo à pesquisa de outros fatores relacionados diretamente com a invasividade dos tumores, como moléculas de adesão intercelular e moléculas relacionadas com a digestão do estroma, para explicar um possível mecanismo particular responsável pela invasão de nervos pequenos, conforme sugerido pela mais alta frequência de superexpressão da *p53* nas lesões com este achado.

Outras associações estatisticamente significativas com a imunorreatividade *em grupamento* para *p53* encontradas no nosso trabalho foram as presenças de mais de um nucléolo proeminente em um mesmo núcleo de célula de carcinoma (magnitude relativamente forte) e de micronódulos de colágeno (magnitude moderada).

Mais de um nucléolo proeminente por núcleo foi um achado identificado em 55,1% da nossa amostra. No estudo de Varma e colaboradores que estudou critérios morfológicos diagnósticos em carcinomas prostáticos, este achado apareceu em 64% dos casos. Como nucléolos relacionam-se com síntese protéica⁸⁷, logo, casos com mutação de um gene

(*TP53*) que suprime tumores pelos mecanismos anteriormente expostos, apresentariam uma atividade de síntese protéica aumentada.

Os micronódulos de colágeno são classicamente definidos como uma reação do estroma prostático ao extravasamento de secreção mucosa dos ácinos malignos.^{42,88} Este achado (micronódulos de colágeno) é infreqüente no carcinoma prostático (0,1-2%)^{45,46,48,49,88}, sendo considerado patognomônico do tumor, pois o tecido benigno da próstata, nas séries estudadas^{46,48,88,89}, não apresentou este tipo de alteração. No nosso estudo, foi identificada uma freqüência maior deste achado (7,2%). O motivo da maior freqüência e da associação encontrada carece de um modelo teórico que a explique, sendo necessários novos estudos para confirmação e melhor esclarecimento deste achado.

7. CONCLUSÕES

Respondendo aos objetivos propostos:

1. Os achados morfológicos associados à superexpressão da *p53* em biópsias transretais de carcinomas prostáticos são micronódulos de colágeno e mais de um nucléolo proeminente no mesmo núcleo de célula de carcinoma prostático, sendo estas associações de magnitude moderada.

2. A invasão de nervos, apenas quando detectada com o auxílio da técnica de imunohistoquímica para a proteína S100, associa-se positivamente com a determinação imunohistoquímica de superexpressão da *p53*, sendo também esta associação de magnitude moderada.

3. A aferição da positividade imunohistoquímica para *p53*, com padrão *em grupamento* apresentou maiores valores de medidas de correlação com o valor do PSA sérico, proporção de tumor no total de tecido amostrado, medida do maior eixo de tumor nas amostras, score de Gleason e presença de invasão de nervos nos carcinomas prostáticos diagnosticados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, quando comparada às demais modalidades testadas em material de punção-biópsia transretal, havendo significância estatística entre a imunorreatividade *em grupamento* e a medida do maior eixo de tumor nas amostras.

8. PERSPECTIVAS

Os micronódulos de colágeno e a presença de mais de um nucléolo em um núcleo de célula de carcinoma em biópsias prostáticas transretais mostram-se como variáveis histológicas promissoras para estudos de determinação de prognóstico nesta doença.

A invasão de nervos, quando detectada com a utilização da imunorreatividade para a proteína S100, constitui-se em um modelo experimental interessante para estudar características biológicas e clínicas dos tumores prostáticos.

9. REFERÊNCIAS

1. Passaglia LMP. Mutação, mecanismos de reparo do DNA e recombinação. In: Zaha A, ed. *Biologia Molecular Básica*. Porto Alegre: Mercado Aberto; 1996. p. 116-134.
2. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 2000;21(6):167-223.
3. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS: Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS, eds. *Robbins & Cotran Patologia. Bases patológicas das doenças*. Rio de Janeiro, Elsevier; 2005. p. 300-333.
4. Liu Y, Kulesz-Martin M. p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding. *Carcinogenesis* 2001;22(6):851-860.
5. Leibovich BC, Cheng L, Weaver AL, Myers RP, Bostwick DG. Outcome prediction with p53 immunostaining after radical prostatectomy in patients with locally advanced prostate cancer. *J Urol* 2000;163(6):1756-1760.
6. Majno G, Joris I. Antitumor defenses. In: Majno G, Joris I, eds. *Cells, tissues, and disease : principles of general pathology*. Cambridge, Mass., Blackwell Science; 1996. p. 885-895.
7. Stackhouse GB, Sesterhenn IA, Bauer JJ, Mostofi FK, Connelly RR, Srivastava SK, et. al. p53 and bcl-2 immunohistochemistry in pretreatment prostate needle biopsies to predict recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 1999;162(6):2040-2045.

8. Shurbaji MS, Kalbfleisch JH, Thurmond TS. Immunohistochemical detection of p53 protein as a prognostic indicator in prostate cancer. *Hum Pathol* 1995;26(1):106-109.
9. Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi KF, McLeod DG, Srivastava S, Moul JW. p53 nuclear protein expression is an independent prognostic marker in clinically localized prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 1995;1(11):1295-1300.
10. Borre M, Stausbol-Gron B, Overgaard J. p53 accumulation associated with bcl-2, the proliferation marker MIB-1 and survival in patients with prostate cancer subjected to watchful waiting. *J Urol* 2000;164:716-721.
11. Eastham JA, Stapleton AM, Gousse AE, Timme TL, Yang G, Slawin KM, et. al. Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1995;1(10):1111-1118.
12. Quinn DI, Henshall SM, Head DR, Golovsky D, Wilson JD, Brenner PC, et.al. Prognostic significance of p53 nuclear accumulation in localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Cancer Res* 2000;60(6):1585-1594.
13. Liu MC, Gelmann EP. P53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. *Semin Oncol* 2002;29(3):246-257.
14. Nichols KE, Malkin D, Garber JE, Fraumeni JF, Jr., Li FP. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(2):83-87.
15. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88(3):323-331.

16. Fernandez PL, Hernandez L, Farre X, Campo E, Cardesa A. Alterations of cell cycle-regulatory genes in prostate cancer. *Pathobiology* 2002;70(1):1-10.
17. Onel K, Cordon-Cardo C. MDM2 and prognosis. *Mol Cancer Res* 2004; 2(1):1-8.
18. Downing SR, Russell PJ, Jackson P. Alterations of p53 are common in early stage prostate cancer. *Can J Urol* 2003;10(4):1924-1933.
19. Grignon DJ, Caplan R, Sarkar FH, Lawton CA, Hammond EH, Pilepich MV, et. al. p53 status and prognosis of locally advanced prostatic adenocarcinoma: a study based on RTOG 8610. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(2):158-165.
20. Scherr DS, Vaughan ED, Jr., Wei J, Chung M, Felsen D, Allbright R, et al. BCL-2 and p53 expression in clinically localized prostate cancer predicts response to external beam radiotherapy. *J Urol* 1999;162(1):12-16; discussion 16-17.
21. Ritter MA, Gilchrist KW, Voytovich M, Chappell RJ, Verhoven BM. The role of p53 in radiation therapy outcomes for favorable-to-intermediate-risk prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53(3):574-580.
22. Benard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP53 family members and human cancers. *Hum Mutat* 2003;21(3):182-191.
23. Epstein JI, Algaba F, Allsbrook Jr. WC, Bastacky, S, Boccon-Gibod L, De Marzo AM, et.al. Tumors of the prostate. In: Eble JN , ed. *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Oxford, Oxford University Press; 2004. p. 159-192.
24. American Cancer Society. Estimated new cancer cases and death, US. American Cancer Society. Atlanta, GA, EUA. Disponível em www.cancer.org. Acesso em 31 de janeiro de 2005.

25. Billis A. Carcinoma. In: Billis A. Patologia Cirúrgica da Próstata. Campinas, Impressão Digital do Brasil; 2003. p. 83-208.
26. Bostwick DG. Neoplasms of the prostate. In: Bostwick DG, Eble JN, eds. Urologic surgical pathology. St. Louis, Mosby-Year Book; 1997. p. 343-442.
27. Young RH, Srigley JR, Amin MB, Ulbright TM, Cubilla AL: Carcinoma of the prostate gland. In: Young RH, ed. Tumors of the prostate gland, seminal vesicles, male urethra, and penis. Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology Armed Forces Institute of Pathology; 2000. p. 111-199.
28. Cezar Junior OP. Fatores prognósticos clínicos, anatomopatológicos e biomoleculares do câncer de mama estágio clínico II [Tese de Doutorado]. Campinas, Universidade Estadual de Campinas; 2001.
29. Instituto Nacional do Câncer - INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Disponível em: www.inca.gov.br. Brasil; 2005. Acesso em 31 de janeiro de 2005.
30. Platz EA, Rimm EB, Willett WC, Kantoff PW, Giovannucci E. Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(24):2009-2017.
31. Bouchardy C, Mirra AP, Khlal M, Parkin DM, de Souza JM, Gotlieb SL. Ethnicity and cancer risk in Sao Paulo, Brazil. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1991;1(1):21-27.
32. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 1990;17(4):337-347.

33. Schulman CC, Zlotta AR. Prevention of prostate cancer. *Recent Results Cancer Res* 2003;163:199-211; discussion 264-196.
34. Ross RK, Coetzee GA, Pearce CL, Reichardt JK, Bretsky P, Kolonel LN, et.al. Androgen metabolism and prostate cancer. Establishing a model of genetic susceptibility. *Eur Urol* 1999;35(5-6):355-361.
35. Mc Neal JE. Anatomy of the prostate: implications for disease. *Pathology of the prostate*. Bostwick DG, ed. New York, Churchill Livingstone; 1990. p. 1-14.
36. Mc Neal JE. Prostate. In: Sternberg SS, ed. *Histology for pathologists*. Philadelphia, Lippincott-Raven; 1997. p. 997-1018.
37. Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. *Jama* 1994;271(5):368-374.
38. Byar DP, Mostofi FK. Carcinoma of the prostate: prognostic evaluation of certain pathologic features in 208 radical prostatectomies examined by the step-section technique. *Cancer* 1972;30(1):5-13.
39. Oesterling JE, Chan DW, Epstein JI, Kimball AW, Jr., Bruzek DJ, Rock RC, et. al. Prostate specific antigen in the preoperative and postoperative evaluation of localized prostatic cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol* 1988;139(4):766-772.
40. Brawley OW. Prostate carcinoma incidence and patient mortality: the effects of screening and early detection. *Cancer* 1997;80(9):1857-1863.
41. McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol* 1988;12(12):897-906.

42. Epstein JI, Yang XJ. Diagnosis of limited adenocarcinoma of the prostate. In: Epstein JI, Yang XJ eds. Prostate biopsy interpretation. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 64-91.
43. Bostwick DG, Dundore PA. Adenocarcinoma. In: Biopsy pathology of the prostate. Bostwick DG, Dundore PA eds. London ; New York, Chapman & Hall Medical, 1997; p. 107-140.
44. Coelho GP, Litvin IE, Guerreiro V, Almanza AA, Edelweiss MIA. Prevalência dos critérios diagnósticos em carcinoma prostático: um estudo de base populacional. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003;39(Suplemento Científico do XXIV Congresso Brasileiro de Patologia):101.
45. Epstein JI. Diagnosis and reporting of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Mod Pathol* 2004;17(3):307-315.
46. Varma M, Lee MW, Tamboli P, Zarbo RJ, Jimenez RE, Salles PG, et.al. Morphologic criteria for the diagnosis of prostatic adenocarcinoma in needle biopsy specimens. A study of 250 consecutive cases in a routine surgical pathology practice. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126(5):554-561.
47. Epstein JI. Diagnostic criteria of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Hum Pathol* 1995;26(2):223-229.
48. Baisden BL, Kahane H, Epstein JI. Perineural invasion, mucinous fibroplasia, and glomerulations: diagnostic features of limited cancer on prostate needle biopsy. *Am J Surg Pathol* 1999;23(8):918-924.
49. Arangelovich V, Tretiakova M, SenGupta E, Krausz T, Yang XJ. Pathogenesis and significance of collagenous micronodules of the prostate. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003;11(1):15-19.

50. Epstein JI. Gleason score 2-4 adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy: a diagnosis that should not be made. *Am J Surg Pathol* 2000;24(4):477-478.
51. Steinberg DM, Sauvageot J, Piantadosi S, Epstein JI. Correlation of prostate needle biopsy and radical prostatectomy Gleason grade in academic and community settings. *Am J Surg Pathol* 1997;21(5):566-576.
52. Spires SE, Cibull ML, Wood DP, Jr., Miller S, Spires SM, Banks ER. Gleason histologic grading in prostatic carcinoma. Correlation of 18-gauge core biopsy with prostatectomy. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118(7):705-708.
53. Egevad L, Norlen BJ, Norberg M. The value of multiple core biopsies for predicting the Gleason score of prostate cancer. *BJU Int* 2001;88(7):716-721.
54. Egevad L, Granfors T, Karlberg L, Bergh A, Stattin P. Prognostic value of the Gleason score in prostate cancer. *BJU Int* 2002;89(6):538-542.
55. McNeal JE, Haillot O. Patterns of spread of adenocarcinoma in the prostate as related to cancer volume. *Prostate* 2001;49(1):48-57.
56. Thompson IM. Observation alone in the management of localized prostate cancer: the natural history of untreated disease. *Urology* 1994;43(2 Suppl):41-46.
57. Adolfsson J, Ronstrom L, Lowhagen T, Carstensen J, Hedlund PO. Deferred treatment of clinically localized low grade prostate cancer: the experience from a prospective series at the Karolinska Hospital. *J Urol* 1994;152(5 Pt. 2):1757-1760.
58. Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond ME, Amin MB, Cohen M, Crawford D, et.al. Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):995-1000.

59. Villers A, McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. The role of perineural space invasion in the local spread of prostatic adenocarcinoma. *J Urol* 1989;142(3):763-768.
60. Litvin IE. Invasão de nervos pelo carcinoma da próstata em biópsias transretais. [Dissertação de mestrado]. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
61. Yang G, Wheeler TM, Kattan MW, Scardino PT, Thompson TC. Perineural invasion of prostate carcinoma cells is associated with reduced apoptotic index. *Cancer* 1996;78(6):1267-1271.
62. Egan AJ, Bostwick DG. Prediction of extraprostatic extension of prostate cancer based on needle biopsy findings: perineural invasion lacks significance on multivariate analysis. *Am J Surg Pathol* 1997;21(12):1496-1500.
63. O'Malley KJ, Pound CR, Walsh PC, Epstein JI, Partin AW. Influence of biopsy perineural invasion on long-term biochemical disease-free survival after radical prostatectomy. *Urology* 2002;59(1):85-90.
64. de la Taille A, Katz A, Bagiella E, Olsson CA, O'Toole KM, Rubin MA. Perineural invasion on prostate needle biopsy: an independent predictor of final pathologic stage. *Urology* 1999;54(6):1039-1043.
65. de la Taille A, Rubin MA, Bagiella E, Olsson CA, Buttyan R, Burchardt T, et. al. Can perineural invasion on prostate needle biopsy predict prostate specific antigen recurrence after radical prostatectomy? *J Urol* 1999;162(1):103-106.
66. Cappello F, Rappa F, David S, Anzalone R, Zummo G. Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis. *Anticancer Res* 2003;23(2B):1325-1331.

67. Heidenberg HB, Sesterhenn IA, Gaddipati JP, Weghorst CM, Buzard GS, Moul JW, et.al. Alteration of the tumor suppressor gene p53 in a high fraction of hormone refractory prostate cancer. *J Urol* 1995;154(2 Pt 1):414-421.
68. Algaba F, Trias I, Santinelli A, Montironi R. TP53 in urologic tumors. *Anal Quant Cytol Histol* 2003;25(3):123-130.
69. Dinjens WN, van der Weiden MM, Schroeder FH, Bosman FT, Trapman J. Frequency and characterization of p53 mutations in primary and metastatic human prostate cancer. *Int J Cancer* 1994;56(5):630-633.
70. Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Goodrow TL, Palmer JL, Nichols WW, et.al. p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(20):1657-1669.
71. Oxley JD, Winkler MH, Parry K, Brewster S, Abbott C, Gillatt DA. p53 and bcl-2 immunohistochemistry in preoperative biopsies as predictors of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *BJU Int* 2002;89(1):27-32.
72. Karaburun Paker S, Kilicarslan B, Ciftcioglu AM, Oztekin S, Sargin FC, Erdogru T, Baykara M. Relationship between apoptosis regulator proteins (bcl-2 and p53) and Gleason score in prostate cancer. *Pathol Oncol Res* 2001;7(3):209-212.
73. Brewster SF, Oxley JD, Trivella M, Abbott CD, Gillatt DA. Preoperative p53, bcl-2, CD44 and E-cadherin immunohistochemistry as predictors of biochemical relapse after radical prostatectomy. *J Urol* 1999;161(4):1238-1243.
74. Stricker HJ, Jay JK, Linden MD, Tamboli P, Amin MB. Determining prognosis of clinically localized prostate cancer by immunohistochemical detection of mutant p53. *Urology* 1996;47(3):366-369.

75. Stapleton AM, Zbell P, Kattan MW, Yang G, Wheeler TM, Scardino PT, et. al. Assessment of the biologic markers p53, Ki-67, and apoptotic index as predictive indicators of prostate carcinoma recurrence after surgery. *Cancer* 1998;82(1):168-175.
76. Deliveliotis C, Skolarikos A, Karayannis A, Tzelepis V, Trakas N, Alargof E, et. al. The prognostic value of p53 and DNA ploidy following radical prostatectomy. *World J Urol* 2003;21(3):171-176.
77. Moul JW, Bettencourt MC, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG, Srivastava S, et. al. Protein expression of p53, bcl-2, and KI-67 (MIB-1) as prognostic biomarkers in patients with surgically treated, clinically localized prostate cancer. *Surgery* 1996;120(2):159-166; discussion 166-157.
78. Kallakury BV, Figge J, Ross JS, Fisher HA, Figge HL, Jennings TA. Association of p53 immunoreactivity with high gleason tumor grade in prostatic adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1994;25(1):92-97.
79. Haussler O, Epstein JI, Amin MB, Heitz PU, Hailemariam S. Cell proliferation, apoptosis, oncogene, and tumor suppressor gene status in adenosis with comparison to benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, and cancer. *Hum Pathol* 1999;30(9):1077-1086.
80. Yang G, Stapleton AM, Wheeler TM, Truong LD, Timme TL, Scardino PT, et. al. Clustered p53 immunostaining: a novel pattern associated with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 1996;2(2):399-401.
81. Uzoaru I, Rubenstein M, Mirochnik Y, Slobodskoy L, Shaw M, Guinan P. An evaluation of the markers p53 and Ki-67 for their predictive value in prostate cancer. *J Surg Oncol* 1998;67(1):33-37.

82. Callegari-Jacques SM. Testes não-paramétricos. In: Callegari-Jacques SM. Bioestatística. Princípios e Aplicações. Porto Alegre, Artmed; 2003. p. 165-184.
83. Erbersdobler A, Fritz H, Schnoger S, Graefen M, Hammerer P, Huland H, et. al. Tumour grade, proliferation, apoptosis, microvessel density, p53, and bcl-2 in prostate cancers: differences between tumours located in the transition zone and in the peripheral zone. *Eur Urol* 2002;41(1):40-46.
84. Partin AW, Yoo J, Carter HB, Pearson JD, Chan DW, Epstein JI, et.al. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol* 1993;150(1):110-114.
85. Rodin AE, Larson DL, Roberts DK. Nature of the perineural space invaded by prostatic carcinoma. *Cancer* 1967;20(10):1772-1779.
86. Hassan MO, Maksem J. The prostatic perineural space and its relation to tumor spread: an ultrastructural study. *Am J Surg Pathol* 1980;4(2):143-148.
87. Junqueira LC. O núcleo celular. In: Junqueira LC, Carneiro J, eds. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan; 2004. p. 52-66.
88. Bostwick DG, Wollan P, Adlakha K. Collagenous micronodules in prostate cancer. A specific but infrequent diagnostic finding. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119(5):444-447.
89. Thorson P, Vollmer RT, Arcangeli C, Keetch DW, Humphrey PA. Minimal carcinoma in prostate needle biopsy specimens: diagnostic features and radical prostatectomy follow-up. *Mod Pathol* 1998;11(6):543-551.

Anexo 1: estadiamento patológico do carcinoma prostático.

(Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (eds.). *World Health Organization Classification of tumors. Pathology and Genetics of tumours of the urinary system and male genital organs*. Lyon: IARC Press; 2004.)

Sistema TNM proposto pela AJCC (American Joint Committee on Cancer). O estadiamento clínico (T, N ou M0 se refere à extensão da doença no pré-operatório, estabelecida através de exames clínico, radiológico e laboratorial. O estadiamento patológico (pT, pN ou pM) refere-se à extensão da doença estabelecida através do exame anatomopatológico. As categorias pT, pN e pM correspondem às categorias T, N e M.

Tumor Primário (T)

- TX Tumor primário não pode ser avaliado.
- TO Não há evidência de tumor primário.
- T1 Tumor é um achado histológico incidental, não é palpável ao toque retal ou visualizado por técnicas de imagem:
 - T1a tumor em 5% ou menos do tecido ressecado;
 - T1b tumor em mais de 5% do tecido ressecado;
 - T1c tumor identificado em biópsia por agulha (PSA elevado, porém tumor não palpável ao toque retal e não visualizado em ultra-sonografia).
- T2 Tumor limitado à próstata sem evidência de extensão extra-prostática^{****}:
 - T2a tumor compromete até metade de 1 lobo, ou menos;
 - T2b tumor compromete mais da metade de 1 lobo, porém não ambos os lobos;

^{****} Tumor encontrado em um ou dois lobos, por biópsia de agulha, mas não palpável ou visualizado por técnicas de imagem, é classificado como T1c.

- T2c tumor compromete ambos os lobos.
- T3 Tumor extra-prostático^{§§§§}:
- T3a extensão extra-capsular (unilateral ou bilateral);
- T3b tumor invade vesícula seminal.
- T4 Tumor está fixo ou invade estruturas adjacentes outras que não a vesícula seminal, colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores ou parede pélvica^{*****}.

Linfonodos regionais (N)

- NX Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
- NO Ausência de metástase em linfonodos regionais.
- N1 Metástase em linfonodo regional.
- N1 (mi) micrometástase de até 0,2 cm.

Metástase à distância (M)

- MX Presença de metástase à distância não pode ser avaliada.
- MO Ausência de metástase à distância.
- M1 Presença de metástase à distância:
- M1a em linfonodo não regional;
- M1b óssea;
- M1c outra localização.

^{§§§§} Invasão do ápice prostático, mas não extra-prostática é classificado como T2.

^{*****} Tumor com invasão microscópica do colo vesical, na prostatectomia radical, é classificado como T3a.

Graduação histopatológica (G)

GX Graduação não pode ser avaliada.

G1 Bem diferenciado (Gleason 2-4).

G2 Moderadamente diferenciado (Gleason 5-6).

G3-4 Pouco diferenciado/indiferenciado (Gleason 7-10).

Tabela 16: Estadiamento do carcinoma da próstata

	T	N	M	G
Estágio I	T1a	N0	M0	G1
Estágio II	T1a	N0	M0	G2,3-4
	T1b,c	N0	M0	Qualquer G
	T1, T2	N0	M0	Qualquer G
Estágio III	T3	N0	M0	Qualquer G
Estágio IV	T4	N0	M0	Qualquer G
	Qualquer T	N1	M0	Qualquer G
	Qualquer T	Qualquer N	M1	Qualquer G

Anexo 2: técnica da imuno-histoquímica

(Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577)

Método da Estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC), de acordo com princípio proposto por Hsu e colaboradores (1981), adaptado às condições do laboratório de patologia do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

1) Preparo das lâminas:

- mergulhar as lâminas em solução de detergente neutro Extran (Merck 7553) a 0,5% em água, por 30 minutos;
- lavar em água corrente por 120 minutos para remoção do detergente;
- lavar as lâminas em água quente;
- secar na estufa;
- guardar as lâminas limpas, em caixas, para evitar contaminações por poeira.

Nota: manipular lâminas com luvas para evitar a contaminação das mesmas pela oleosidade da pele.

2) Sinalização das lâminas:

- imersão das lâminas em acetona por 2 minutos;
- imersão em 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS) a 4% por 2 minutos;
- imersão em acetona por 4 vezes;
- secar em estufa, deixar esfriar e guardar em caixas fechadas.

3) Cortes histológicos:

- As fitas de parafina obtidas no processo de corte pela microtomia, são cuidadosamente colocadas em banho-maria histológico e os cortes depositados em

lâminas previamente tratadas com APTS. As lâminas com os cortes são levadas à estufa, a 60°C e lá deixadas por 24 horas, para melhorar a adesão do tecido.

4) Preparação do corte histológico:

- xilol 60°C por 15 minutos;
- xilol à temperatura ambiente por 15 minutos;
- etanol a 100% (3x) por 30 segundos cada;
- etanol 95% por 30 segundos;
- etanol 80% por 30 segundos;
- etanol 70% por 30 segundos;
- lavar em água corrente e destilada.

5) Bloqueio da Peroxidase Endógena:

- três banhos de 10 minutos cada com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol;
- lavar por três minutos em água corrente;
- deixar um minuto em água destilada.

6) Recuperação Antigênica:

- colocar as lâminas no forno de microondas, em potência máxima, por 9 minutos (2x), imerso em tampão citrato 10mM pH 6,0 e tampão EDTA 1mM pH 8,0;
- deixar esfriar por sessenta minutos;
- lavar em água corrente e água destilada.

7) Bloqueio da Avidina Endógena:

- colocar por quinze minutos, em solução com clara de ovo e água destilada (clara de um ovo para duzentos ml de água destilada);
- lavar em água corrente e destilada.

8) Bloqueio das Reações Inespecíficas:

- colocar em solução de leite desnatado a 5% em tampão fosfato salino (PBS), durante 30 minutos;
- lavar em água corrente por 4 minutos e água destilada por 1 minuto;
- colocar no PBS por 5 minutos.

9) Incubação com Anticorpo Primário:

- secar cuidadosamente as lâminas;
- colocá-las em uma câmara úmida sobre uma esponja umedecida;
- pingar 70-100 microlitros do anticorpo primário na diluição 1:100, sobre os cortes;
- deixar incubando dentro da geladeira a 4°C, por 16 horas;
- interromper a reação, lavando cada lâmina delicadamente com um jato de solução tampão;
- transferir as lâminas para um recipiente, contendo tampão PBS, dando 3 banhos, de 5 minutos cada;
- secar as lâminas.

10) Incubação com o Anticorpo Secundário:

- incubar com o anticorpo secundário, conjugado com a biotina (anti-Ig da espécie animal em que foi obtido o anticorpo específico), deixando 30 minutos, a 37°C, na estufa e em câmara úmida;
- interromper a reação, lavando cada lâmina delicadamente com um jato de solução tampão;
- transferir as lâminas para um recipiente, contendo tampão PBS, dando três banhos de 5 minutos cada.

11) Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase:

- pingar o complexo avidina-biotina-peroxidase, deixando na estufa a 37°C, em câmara úmida, durante 30 minutos;
- lavar cada lâmina delicadamente com um jato de solução tampão;
- transferir as lâminas para um recipiente contendo tampão PBS, dando 3 banhos de 5 minutos cada.

12) Cromógeno:

- incubar as lâminas em solução substrato, o cromógeno (Diaminobenzidina – DAB – 60mg%) por 3 minutos a 37°C no escuro;
- lavar bem com água corrente e transferir para água destilada.

13) Contracorar:

- contracorar com hematoxilina de Harris por 2 minutos;
- lavar em água corrente.

14) Montagem:

- desidratar as lâminas em etanol 50%, etanol 80%, etanol 95% , etanol 100% (3x) e xilol (3x);
- colocar a lamínula sobre a lâmina com Entellan (Merck 1.07961) para leitura em microscopia óptica e preservação da amostra.

Anexo 3: graduação de Gleason em biópsias

(Bostwick DG, Dundore PA: Grading. In: Biopsy pathology of the prostate. Bostwick DG, Dundore PA (eds.). London ; New York, Chapman & Hall Medical, 1997, pp. 146-147.)

Tabela 17: Treze dicas para a graduação histológica de Gleason em biópsias por agulha. Escore (ou soma) de Gleason = soma dos graus (ou padrões) primário e secundário (p.ex.: Gleason 3 + 4 = 7).

Dica n° 1: pequenos focos de carcinoma não necessariamente significam carcinoma de baixo grau.

Com o advento da dosagem sérica de PSA e da biópsia em sextante, pequenos focos de carcinoma são frequentemente encontrados em biópsias por agulha. Entretanto, estes focos pequenos não são necessariamente lesões de baixo grau somente por serem pequenos. Carcinomas de alto grau (com padrões de Gleason 4 e 5) freqüentemente infiltram-se como faixas irregulares de células imediatamente abaixo do limite da próstata e uma pequena porção pode ser amostrada na biópsia, resultando em muito poucos ácinos no espécime. Em raras situações, a única evidência de câncer pode ser alguns ácinos circundando alguns nervos; estes pequenos focos são normalmente de padrão 3 ou 4 de Gleason na nossa experiência.

Dica n° 2: provavelmente não se trata do padrão 1 de Gleason.

Os padrões 1 e 5 de Gleason são os menos comuns em qualquer tipo de espécime prostático, incluindo prostatectomias radicais e biópsias. O padrão 1 é normalmente visto na zona de transição, uma área infreqüentemente amostrada em biópsias por agulha. Além disso, estes tumores normalmente são pequenos. Em um estudo de 300 biópsias na Clínica Mayo com biópsias por agulha, apenas 1 caso tinha o padrão 1 (padrão secundário 1; padrão primário 2).

Dica n° 3: para identificar o padrão 1, o câncer deve ser circunscrito.

A principal diferença entre os padrões 1 e 2 é a presença e ausência de circunscrição, respectivamente. As biópsias por agulha dificilmente amostram toda a lesão, virtualmente impossibilitando a avaliação completa das bordas da lesão para avaliar a circunscrição. Consequentemente o grau padronizado para os carcinomas de baixo grau que se apresentam como glândulas uniformes em biópsias é 2.

Dica n° 4: o padrão 2 de Gleason deve satisfazer os 3 erres nas glândulas: arredondadas (*rounded*), regularmente espaçadas e relativamente uniformes em forma.

O padrão 2 de Gleason consiste basicamente de glândulas arredondadas, sem bordas anguladas ou de tamanhos distorcidos. Quase tão importante quanto a regularidade é o espaçamento – os ácinos do padrão 2 costumam ser regularmente espaçados por toda a extensão do foco de lesão, ao contrário dos do padrão 3 que são irregularmente espaçados.

Dica n 5: os ácinos do padrão 2 podem estar próximos uns aos outros, mas devem ter estroma interveniente e ausência de distorção significativa na forma.

Se um amontoamento acinar significativo com alguma perda de estroma interacinar for presente, isto deve mais acuradamente ser categorizado como padrão 3. Qualquer distorção significativa da forma dos ácinos constitui o padrão 3.

Dica n° 6: trata-se provavelmente do padrão 3.

O padrão “standard” para o carcinoma prostático é 3, reconhecendo-se que a maioria dos focos de tumor é deste padrão que ocupa o centro da curva normal. Mais de 80% dos casos da série original de Gleason eram padrão 3. Não hesite em diagnosticar um escore 6 (3 + 3) em biópsias por agulha simplesmente porque os cinco casos anteriores de carcinoma tiveram o mesmo padrão.

Dica n° 7: se há uma variabilidade de 2 vezes no tamanho de ácinos, provavelmente é o padrão 3 ao invés de 2.

Quando os ácinos são regularmente espaçados, uma variação de 2 vezes em tamanho entre ácinos distingue o padrão 3 do padrão 2. Qualquer variação menor que isto pode representar o padrão 2 (exceções existem – ver dica 8)

Dica n° 8: mesmo com uma uniformidade relativa de tamanho de ácinos, extremidade anguladas destes ou distorção da forma indica o padrão 3 e não o 2.

Angulação acinar significativa viola a regra número 4, desrecomendando o padrão 2. Algumas áreas do padrão 3 podem apresentar ácinos relativamente regulares com ou sem amontoamento acinar. Este aspecto freqüentemente tem ácinos menores que os do padrão 2. A perda do arredondamento dos ácinos indica que se trata do padrão 3 ao invés do 2.

Dica n° 9: “fusão é fusão é fusão” (padrão 4 de Gleason).

Fusão acinar diferencia a maioria dos casos de padrão 4 do padrão 3. Este é um ponto de corte crítico na graduação do carcinoma prostático, pois indica câncer pouco diferenciado. Felizmente, este é um dos pontos de corte mais reprodutíveis, devido à necessidade de fusão de ácinos para o diagnóstico de padrão 4. Se uma linha puder ser traçada ao redor dos ácinos, não há fusão, então, trata-se de padrão 3 (ver dica número 10).

Dica n° 10: se uma linha puder ser traçada entre ácinos sem estroma interveniente (fusão) por uma extensão superior a 4 vezes a espessura do ácino, constitui-se de padrão 4.

Ácinos tubulares tortuosos do padrão 3 cortados tangencialmente podem mimetizar o padrão 4 e esta expansão acinar deve ser desconsiderada. Em casos difíceis, se a extensão da fusão for inferior a 4 vezes a espessura do ácino, nós consideramos como padrão 3.

Dica n° 11: se for cribriforme ou quase sólido, provavelmente é padrão 4.

Ácinos cribriformes são usualmente padrão 3 (com comedonecrose, padrão 5). Entretanto, quando os lúmens perdem seu formato arredondado e rígido e tornam-se colapsados ou quase sólidos, é melhor considerar a possibilidade de padrão 4. Da mesma maneira, quando os grupamentos cribriformes perdem seus contornos regulares, isto indica progressão para padrão 4.

Dica n° 12: a perda da maioria dos lúmens acinares nas glândulas fusionadas indica padrão 5.

A maioria dos lúmens acinares deve estar obliterada para que se prefira o padrão 5 ao 4. Tangenciamento do corte e artefatos de esmagamento podem obscurecer os lúmens. Entretanto, se a maioria dos ácinos não tiver lúmen, trata-se de padrão 5.

Dica n° 13: na dúvida, duplique o padrão para gerar o escore.

Em focos pequenos de câncer, é freqüentemente melhor duplicar o padrão para gerar o escore. Nós invariavelmente fazemos isto quando há menos de 5% do total de tecido da biópsia envolvido por câncer, a menos que exista nitidamente um padrão secundário (isto quase nunca ocorre).

Anexo 4: etapas do trabalho de dissertação de mestrado de Litvin relevantes para o entendimento dos métodos de avaliação de invasão de nervos no carcinoma prostático.

(Litvin IE: Invasão de nervos pelo carcinoma da próstata em biópsias transretais [Dissertação de Mestrado]. Programa de pós-graduação em medicina - Cirurgia. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.)

A tabela 18 apresenta a ordem cronológica da coleta de dados referentes aos nervos.

Tabela 18: Etapas do trabalho de Litvin e colaboradores

Etapas do Trabalho	Instrumento de Aferição
Contar o número de nervos, medir o maior diâmetro e situá-los na coloração pelo HE	MO + RMO
Contar o número de nervos invadidos pelo tumor e medir o maior diâmetro na coloração pelo HE	MO + RMO
Contar o número de nervos, medir o maior diâmetro e situá-los na coloração pelo S100	MO + RMO
Contar o número de nervos, medir o maior diâmetro e situá-los na coloração pelo S100	MO + RMO

MO: microscópio óptico; RMO: retículo de medida ocular.

Os nervos foram definidos como bandas de, pelo menos, três células de espessura, paralelas, com configuração fascicular. Não foram considerados nervos qualquer marcação positiva do S-100 em um fascículo com menos de 3 células paralelas ou menor do que 0,0083 milímetros de diâmetro, pois poderiam representar células dendríticas. A medida só foi utilizada como critério, quando houve controvérsia entre os patologistas sobre quantas células paralelas havia. Esta medida, 0,0083 mm, foi utilizada como limítrofe, pois representava a menor medida que o RMO permite fazer (1 unidade padrão) na objetiva de 40 vezes (tabela 19) e por corresponder a aproximadamente, três células paralelas (fig. 15).

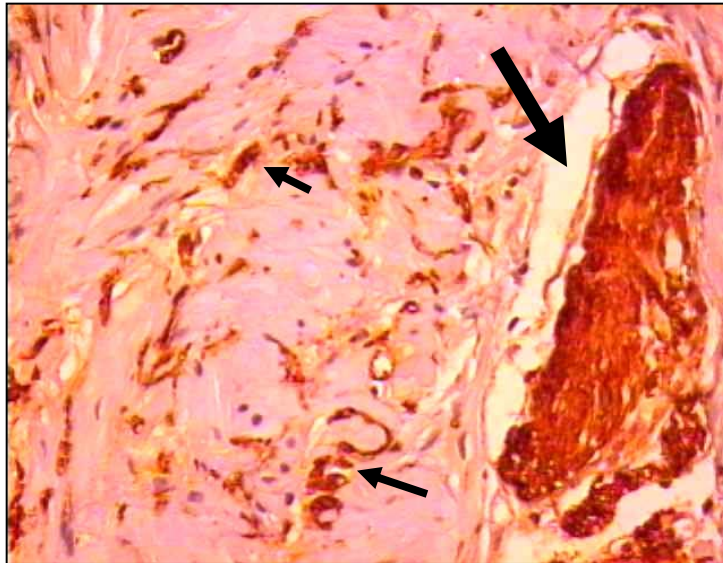


Fig. 15: Marcação de nervo (seta maior) pela proteína S100 – 400x – e marcação de estruturas pelo mesmo anticorpo menores que o tamanho mínimo considerado como nervo (setas menores)

Tabela 19: Padronização das unidades (mm) do retículo de medida ocular

Linhas: unidades do retículo de medida ocular \ Colunas: aumento das objetivas

	2,5x	10x	20x	40x
1	0,1181	0,0333	0,0166	0,0083
2	0,2363	0,0666	0,0333	0,0166
3	0,3545	0,1	0,05	0,025
4	0,4727	0,1333	0,0666	0,0333
5	0,5909	0,1666	0,0833	0,04166
6	0,7090	0,2	0,1	0,05
7	0,8272	0,2333	0,1166	0,0583
8	0,9454	0,2666	0,1333	0,0666
9	1,0636	0,3	0,15	0,075
10	1,1818	0,333	0,1666	0,0833
11	1,3	0,3666	0,1833	0,0916
12	1,4181	0,4	0,2	0,1
13	1,5363	0,4333	0,2166	0,1083
14	1,6545	0,4666	0,2333	0,1166

Os nervos foram medidos com o RMO nos dois maiores eixos, independentemente da sua morfologia (o nervo que é tridimensional pode assumir diversos formatos nos preparados histológicos, em virtude da incidência do corte). O menor eixo foi considerado como o diâmetro. Reconheceu-se que um único nervo pode aparecer seccionado em várias porções, produzindo uma contagem maior de número absoluto de nervos.

A invasão neural foi definida como glândulas de carcinoma da próstata circundando parcial ou totalmente um fascículo neural. Também foi considerada invasão de nervo a presença de glândulas ou grupos de células epiteliais atípicas no interior dos nervos. A distinção entre invasão e justa-posição perineural foi considerada. Justa-posição foi definida como glândulas benignas ou neoplásicas extrínsecas ao espaço perineural que focalmente comprimem o nervo.

A comparação dos dois grupos (técnica do HE e técnica imuno-histoquímica) foi realizada pelo teste t de Student e na assimetria pelo teste t de Wilcoxon. Nos dados categóricos utilizou-se o teste qui-quadrado de Mc Nemar.

Para a comparação, quanto à invasão de nervos (Grupo I: ausência de invasão de nervo no HE e no S-100; Grupo II: presença de invasão de nervo no HE e no S-100 e Grupo III: presença de invasão de nervo somente no S-100) foi realizada, para as variáveis assimétricas, transformação de *rank* previamente a ANOVA e, após o teste de Tuckey. Nas variáveis com distribuição normal foi realizada a ANOVA.

Em alguns cálculos, para variáveis quantitativas, não foram utilizados todos os 70 pacientes, pois em avaliação prévia, com cálculo de tamanho de amostra, pôde se reduzir o número de casos avaliados sem perda do poder estatístico.

Anexo 5: coeficientes de correlação e associação – padronização de tamanho de efeito.

(Kotrlík JW, Williams HA. The Incorporation of Effect Size in Information Technology, Learning, and Performance Research. *Information Technology, Learning and Performance Journal*, 2003; 21(1): 1-7.)

Tabela 20: Alguns parâmetros para interpretação de tamanho de efeito

FONTE	ESTATÍSTICA	VALOR	INTERPRETAÇÃO
Rea & Parker, 1992	<i>phi</i> ou “V” de Cramer	0,0 —0,1	Associação Insignificante
		0,1 —0,2	Associação Fraca
		0,2 —0,4	Associação Moderada
		0,4 —0,6	Associação Relativamente Forte
		0,6 —0,8	Associação Forte
		0,8 —1,0	Associação Muito Forte
Davis, 1971	Coeficientes de Correlação†	≥7	Associação Muito Forte
		0,5 – 0,69	Associação Substancial
		0,3 – 0,49	Associação Moderada
		0,1 – 0,29	Associação Fraca
		0,01 – 0,09	Associação Insignificante
Hinkle, Wiersma & Jurs 1979	Coeficientes de Correlação†	0,9 – 1,0	Correlação Muito Alta
		0,7 – 0,9	Correlação Alta
		0,5 – 0,7	Correlação Moderada
		0,3 – 0,5	Correlação Baixa
		0,0 – 0,3	Correlação Pequena ou Ausente
Hopkins 1997	Coeficientes de Correlação†	0,9 – 1,0	Correlação Quase Perfeita
		0,7 – 0,9	Correlação Muito Grande
		0,5 – 0,7	Correlação Grande
		0,3 – 0,5	Correlação Moderada
		0,3 – 0,1	Correlação Pequena
		0,0 – 0,1	Correlação Praticamente Ausente

† Produto-momento de Pearson e Spearman (R_s)

**RELAÇÃO ENTRE OS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS
HISTOLÓGICOS E A EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA P53
NO CARCINOMA PROSTÁTICO**

Coelho GP[§], Litvin IE*, Edelweiss MIA[†]

[§] Médico patologista, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da UFRGS.

* Médico patologista, mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da UFRGS.

[†] Professora Adjunto do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRGS.

Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Correspondência para: Guilherme Portela Coelho
Rua Os Dezoito do Forte, 1544/902
95020-472 – Caxias do Sul, RS – Brasil
e-mail: gcoelho@terra.com.br

RESUMO

Introdução e Objetivo: o gene *TP53* é o alvo isoladamente mais comum de mutação em tumores humanos. Está envolvido no bloqueio do ciclo celular, reparo ao DNA, diferenciação celular e apoptose, em resposta ao dano genético. O exame de imuno-histoquímica (IHQ) pode detectar o acúmulo da proteína *p53* no núcleo celular, indicando mutação. Esta mutação tem sido associada a comportamento agressivo nos carcinomas prostáticos. O conhecimento das características histológicas deste carcinoma permite o estabelecimento de critérios diagnósticos anatomopatológicos e de gradações histológicas que visam a um melhor atendimento dos pacientes com a doença. O estudo da relação entre os achados de biologia molecular e as características histológicas desta neoplasia leva a um maior conhecimento de mecanismos que produzem as alterações morfológicas teciduais, auxiliando na identificação de novas variáveis promissoras na determinação do comportamento biológico da doença.

Material e Método: foram examinadas amostras de 101 exames de biópsias por agulha da próstata, de setenta pacientes com carcinoma, através de lâminas coradas pelo HE, selecionados de 500 exames consecutivos. Obtiveram-se novos cortes dos mesmos blocos de parafina, sendo estes corados pela técnica de IHQ, utilizando o anticorpo monoclonal DO7 para *p53*, em 69 dos pacientes. Foram anotados, para estudo de associação, os achados morfológicos, o padrão da coloração IHQ para *p53*, a presença de invasão de nervos (IN) pelas colorações HE e de IHQ para proteína S100 e algumas características clínico-laboratoriais dos pacientes com carcinoma prostático.

Resultados: dentre as formas de aferir a positividade IHQ *p53*, a imunorreatividade *em grupamento* foi o padrão que melhor se correlacionou com os achados clínico-patológicos examinados: PSA sérico, escore de Gleason, quantidade de tumor na amostra ($p < 0,01$) e presença de invasão de nervo. Dentre os critérios diagnósticos estudados, houve associação estatisticamente significativa da imunorreatividade *em grupamento* para *p53* com as presenças de micronódulos de colágeno e mais de um nucléolo proeminente no mesmo núcleo de célula neoplásica. Quanto à IN, apenas quando a mesma foi identificada com a técnica de IHQ (proteína S100), houve associação estatisticamente significativa.

Conclusão: o padrão de imunorreatividade *em grupamento* mostra-se superior aos demais quando comparado aos achados anatomopatológicos com valor preditivo em biópsias e com o valor do PSA sérico. A associação estatisticamente significativa entre a imunorreatividade *em grupamento* para *p53* e a presença de IN detectada com a utilização da proteína S100 contrasta com a ausência de significância quando a IN é identificada na histologia convencional (HE). Estes achados recomendam novos estudos para verificar a utilidade da determinação IHQ da IN no prognóstico da doença e para identificar o mecanismo molecular de invasão de nervos de pequeno tamanho que não são facilmente identificados no HE. A presença da associação da positividade IHQ para *p53* com micronódulos de colágeno igualmente recomenda novos estudos clínicos e moleculares para esclarecimento da relação deste achado histológico com o comportamento biológico do carcinoma prostático.

Palavras-chave: carcinoma da próstata, *TP53*, S100, imuno-histoquímica, histologia, histopatologia, critérios diagnósticos, biópsia transretal.

ABSTRACT

Background: *TP53* is the single most common target of mutation in human tumors. It is involved in the blockage of the cell cycle, DNA repair, cell differentiation and apoptosis, in response to genetic damage. Immunohistochemistry (IHC) can detect the accumulation of the *p53* protein in the cell nucleus, indicating mutation. This finding has been associated with aggressive behavior in prostatic carcinomas. Knowing the histological characteristics of this carcinoma allows pathologic diagnostic criteria and grading systems to provide better care to patients who have this disease. The study of the relationship between molecular biology findings and the histological characteristics of this neoplasm leads to greater knowledge of the mechanisms that produce morphological changes in tissue, helping to identify promising new variables to determine the biological behavior of the disease.

Methods: samples of 101 needle biopsies of the prostate were examined, from seventy patients with prostatic carcinoma, in sections stained with hematoxylin and eosin (HE), selected from 500 consecutive examinations. New sections were obtained from the same paraffin blocks and were immunostained using the monoclonal antibody DO7 for *p53*, in 69 of the patients. For purposes of the association analysis, the morphological findings, the pattern of immunostaining for *p53*, the presence of perineural invasion (by HE and IHC staining for S100 protein) and some clinical and laboratory characteristics of patients with prostatic carcinoma were noted.

Results: among the ways used to measure IHC positivity for the *p53*, clustered immunostaining was best correlated with the clinicopathologic findings examined: serum PSA, Gleason score, amount of tumor in the sample ($p < 0.01$) and the presence of perineural invasion (PNI). Of the diagnostic criteria, there was a statistically significant association of clustered *p53* immunostaining with the presence of collagen micronodules and the finding of more than one prominent nucleolus in the same nucleus of neoplastic cell. Statistically significant association also occurred when PNI was identified with S100 protein.

Conclusion: clustered *p53* immunostaining was best correlated than others staining patterns, when compared to the pathologic findings with prognostic value in biopsies and with the serum PSA. The statistically significant association of clustered *p53* immunostaining and the presence of PNI detected with the use of S100 protein contrasts with the absence of significance when PNI was identified in conventional histology (HE). New studies are recommended to verify the usefulness of IHC detection of PNI in the prognosis of the disease and to identify the molecular mechanism of invasion of small nerves that are not easily identified in HE stained slides. The presence of the association of IHC positivity for *p53* with collagen micronodules also recommends new clinical and molecular studies to account for the relationship between this histological finding and the biological behavior of prostatic carcinoma.

Key words: prostatic carcinoma, *TP53*, S100, immunohistochemistry, histology, histopathology, diagnostic criteria, needle biopsy.

INTRODUÇÃO

O dano não letal ao DNA é o cerne da carcinogênese. Este dano pode ser adquirido através da ação de agentes químicos, físicos e/ou biológicos.¹⁻³ A hipótese genética do câncer tem na sua fundamentação a premissa de que os tumores são expansões clonais de uma única célula que sofreu dano ao seu material genético.⁴

O gene *p53* ou *TP53* é um dos genes relacionados ao câncer mais estudados. Codifica uma proteína de 53kD com o mesmo nome, a proteína *p53*, que é responsável pela sua função biológica.⁵ Está localizado no cromossomo 17p13.1 e é o alvo isoladamente mais comum de mutação em tumores humanos.^{4,6-9} Mais de 70% dos tumores humanos contém algum defeito neste gene e grande parte dos que não apresentam este defeito têm outros em genes que influenciam na sua expressão.⁴ Suas atividades normais compreendem: a) parar temporariamente o ciclo celular prolongando a fase G1, entre a mitose e a fase de síntese, promovendo tempo extra para reparo a dano no DNA; b) desencadear o processo de apoptose na célula também em resposta a dano no DNA; c) estimular a transcrição de genes relacionados com a diferenciação dos tecidos, encaminhando a célula a um sentido oposto ao da carcinogênese.^{4,5,7,9-12}

Adenocarcinomas prostáticos variam desde cânceres que formam glândulas bem diferenciadas, onde eventualmente pode ser difícil de defini-los como carcinomas, até tumores pobremente diferenciados, onde pode ser difícil determinar que a origem do câncer seja prostática. Uma característica comum é a ausência de células basais, em contraste com o epitélio prostático benigno.¹³⁻¹⁵

O diagnóstico do carcinoma prostático depende do reconhecimento de uma quantidade grande de características teciduais que podem ser arquiteturais, nucleares, citoplasmáticas ou intraluminares dos ácinos neoplásicos.¹³⁻¹⁸

Os achados de formações glomerulóides, fibroplasia mucinosa (ou micronódulos de colágeno) e a invasão de nervos são considerados específicos para carcinoma por não terem sido descritos em glândulas benignas.¹⁹⁻²¹ As formações glomerulóides são ácinos com proliferações luminares de células em conformação cribriforme aparentemente aderidas a um ponto da “parede” deste mesmo ácino, lembrando a estrutura de um glomérulo. A fibroplasia mucinosa caracteriza-se por um tecido fibroso pouco celular em forma de pequenos nódulos possivelmente correspondendo a uma reação estromal, classicamente atribuída ao extravasamento de conteúdo luminal mucóide dos ácinos malignos. O estudo de Arangelovich e colaboradores²² que analisou estas estruturas ultra-estruturalmente, refere que as mesmas são constituídas por bandas de colágeno fragmentadas envoltas por material semelhante à membrana basal. No referido estudo, não foi encontrado resquício de muco nestas estruturas. A invasão de nervos é um achado específico desde que diferenciada de justa-posição de nervos por glândulas benignas ou malignas, fator que pode confundir o observador.^{15-17,19,23}

Acredita-se que a invasão neural seja via para disseminação extra-prostática do carcinoma.²⁴ McNeal e colaboradores²⁵ demonstraram que 85% dos casos de penetração capsular estão relacionados com a invasão neural. A invasão neural pelo carcinoma da próstata não é um efeito somente de volume, pois carcinomas pequenos também podem apresentar invasão de nervo.²⁶ Yang e colaboradores²⁷ relataram que o componente neural favorece o crescimento da neoplasia inibindo a apoptose, o que facilitaria a disseminação do carcinoma através dos nervos, mesmo em carcinomas considerados pequenos. O valor da identificação de invasão de nervos é controverso como fator preditivo independente em análises multivariadas²⁸⁻³², após consideração do grau de Gleason, PSA sérico pré-operatório e quantidade de tumor na biópsia.

A demonstração da expressão imuno-histoquímica de marcadores moleculares como fatores prognósticos ou preditivos ainda não se mostrou comprovadamente útil na assistência aos pacientes com carcinoma prostático. Estudos com biópsias transretais são conflitantes no que se refere à capacidade da imunorreatividade para *p53* em determinar prognóstico previamente ao tratamento.^{7,33-36} Neste tipo de material, muitos trabalhos mostram correlação positiva entre a superexpressão desta proteína e o comportamento biológico do carcinoma prostático, algumas vezes independentemente de fatores prognósticos clássicos.^{5,10,12,37} No entanto, muito provavelmente devido à sua baixa especificidade³³ e às questões metodológicas envolvidas na determinação indireta da mutação do *TP53*, este achado ainda não se apresenta útil no atendimento aos pacientes.

MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo avaliou amostras de tecido de 70 pacientes, submetidos à biópsia transretal da próstata, com carcinoma, em um período de seis meses, realizadas pelo Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Estes casos foram selecionados a partir de 500 exames consecutivos de biópsias por agulha, dos quais 101 (provenientes de 70 pacientes) apresentaram carcinoma da próstata. A técnica da biópsia, incluindo o número de fragmentos obtidos e locais biopsiados, variou de acordo com a indicação do médico urologista e/ou radiologista. Não foi definido pelo presente estudo um único médico que efetuará as biópsias, nem uma padronização da técnica.

Os fragmentos biopsiados foram encaminhados e processados no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A técnica da imuno-histoquímica foi efetuada no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Foram excluídos casos de biópsias por agulha da próstata sem carcinoma, casos “suspeitos, mas não diagnósticos de carcinoma” e casos diagnosticados como carcinoma no exame histológico pela coloração HE, que apresentaram perda de tecido nos novos cortes realizados para a técnica de imuno-histoquímica em quantidade suficiente para que o tumor não fosse morfológicamente identificado nestes novos cortes.

Foram analisados, após consulta do prontuário médico dos pacientes, parâmetros prévios à biópsia, como idade do paciente e PSA sérico total.

Todas as biópsias foram fixadas em formalina tamponada a 10%, processadas (desidratação em álcool etílico de concentrações crescentes, clareamento em xilol, impregnação por parafina fundida) e incluídas em blocos de parafina. Os blocos de parafina contendo os tecidos incluídos foram seccionados pela navalha de aço do micrótomo, obtendo-se cortes com cerca de 5 μ m (5 micrômetros = 0,005 milímetros) de espessura. As lâminas preparadas foram coradas pelo método da hematoxilina e eosina (HE). Numa segunda etapa, os mesmos blocos de parafina foram novamente seccionados no micrótomo, obtendo-se novos cortes com cerca de 5 μ m de espessura. Estes foram corados pela técnica imuno-histoquímica (complexo streptavidina-biotina-peroxidase), utilizando o anticorpo para a proteína *p53* (Dako®, *mouse anti-human*, monoclonal, clone DO-7, diluição: 1:100) que reconhece tanto as formas mutantes quanto a forma normal ou “selvagem” da proteína *p53*. Cortes de tecido de tumores mamários reconhecidamente positivos para a reação serviram de controle positivo para toda a bateria de testes. Para estudo da invasão de nervos, cortes histológicos foram corados também pela técnica imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo policlonal para a proteína S-100 (Novocastra®, policlonal líquida,

diluição de 1:200). Cortes de tecido intestinal (plexo nervoso mioentérico), incluídos em parafina, serviram de controle positivo para toda a bateria de testes.

Todas as biópsias foram avaliadas simultaneamente por dois patologistas, em um microscópio óptico de dupla observação e as discordâncias resolvidas por consenso.

Inicialmente foram estudadas todas as biópsias coradas pelo HE e, numa segunda etapa, com intervalo mínimo de seis meses, foram observadas todas as biópsias coradas pela imuno-histoquímica para a proteína S-100 e para *p53*.

Foi utilizado um microscópio óptico de dupla observação, da marca Zeiss, modelo Standard 20, com quatro objetivas (2,5, 20, 40 e 100 aumentos) e ocular com aumento de dez vezes. O diâmetro do campo de microscopia com objetiva de 400 aumentos é 0,4 mm.

A extensão dos fragmentos foi medida a olho nu com a régua milimetrada, colocada sobre a lâmina de vidro. A espessura do maior fragmento foi obtida em unidades padrão de um instrumento chamado de retículo de medida ocular (RMO), acoplado a uma das oculares do microscópio. Após transformar as unidades em milímetros, somaram-se todas as extensões dos fragmentos e multiplicou-se o resultado pela espessura, como se fosse um retângulo.

A extensão do carcinoma da próstata foi medida sob microscopia óptica com régua milimetrada própria para uso em microscopia óptica, colocada sobre a lâmina de vidro, entre esta e a objetiva. A maior espessura do carcinoma entre todos os fragmentos envolvidos por tumor foi obtida em unidades padrão do RMO. Após transformarem-se as unidades em milímetros, somaram-se todos os focos de carcinoma e multiplicou-se o resultado pela espessura, como se fosse um retângulo.

A proporção de carcinoma de cada paciente foi obtida dividindo-se a área total de carcinoma pela área total de fragmentos nos cortes histológicos.

Os nervos foram definidos como bandas de, pelo menos, três células de espessura, paralelas, com configuração fascicular. Não foi considerada nervo qualquer marcação positiva do S-100 em um fascículo com menos de 3 células paralelas ou menor do que 0,0083 milímetros de diâmetro, pois poderiam representar células dendríticas (fig.1). A medida só foi utilizada como critério quando houve controvérsia entre os patologistas sobre quantas células paralelas havia. Esta medida, 0,0083 mm, foi utilizada como limítrofe, pois representava a menor medida que o RMO permite fazer (1 unidade padrão) na objetiva de 40x e por corresponder a aproximadamente, três células paralelas.

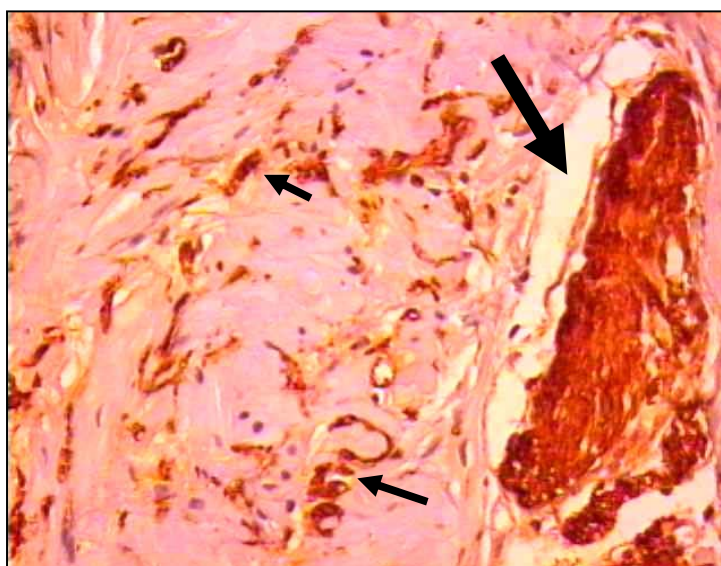


Fig. 1. Marcação de nervo (seta maior) pela proteína S100 – 400x – e marcação de estruturas pelo mesmo anticorpo menores que o tamanho mínimo considerado como nervo (setas menores).

A invasão neural foi definida como glândulas de carcinoma da próstata circundando parcial ou totalmente um fascículo neural. Também foi considerada invasão de nervo a presença de glândulas ou grupos de células epiteliais atípicas no interior dos nervos. A distinção entre invasão e justa-posição perineural foi considerada. Justa-posição foi

definida como glândulas benignas ou neoplásicas extrínsecas ao espaço perineural que focalmente comprimem o nervo.

Foram inicialmente considerados como positivos para a reação imuno-histoquímica, todos os casos com marcação nuclear no tumor, em qualquer quantidade e intensidade, desde que esta marcação não fosse interpretada como defeito técnico, sendo para isto utilizados como auxiliares os exames de controle. Este tipo de marcação foi identificada como “*p53*”. Dos casos positivos para “*p53*”, foram ainda coletadas informações referentes à quantidade de núcleos positivos dentre o total de núcleos de carcinoma, na forma de percentagem, avaliada subjetivamente e identificada como “*p53prop*”, podendo variar teoricamente entre 0 (zero)% e 100%, e intensidade da reação (“*p53int*”), em escore de 0 (zero) a 3, sendo assinalado o valor 3 para os casos com núcleos corados com maior intensidade e 0 (zero) para os casos sem marcação (ou negativos). A avaliação da intensidade também utilizou os controles como parâmetro. Nos casos onde foram encontrados, em um mesmo campo microscópico de 400x, 15 ou mais núcleos positivos, em qualquer intensidade, foi utilizada a designação de positividade para *p53 em grupamento* (“*p53g*”).

A comparação entre as modalidades de aferição da positividade imuno-histoquímica para *p53* e os achados histológicos, PSA sérico e idade dos pacientes foi efetuada através da obtenção do coeficiente de correlação de Spearman. Quando comparadas duas variáveis nominais dicotômicas, foi utilizado também o coeficiente *phi*. O teste de significância, nas variáveis medidas em escala ordinal, foi feito através da aferição da significância da correlação de Spearman (*r_s*), que é feita através do teste “t” de Student. A significância do coeficiente *phi* é calculada a partir do teste do qui-quadrado de Pearson. Para qualificar a

magnitude das associações, utilizaram-se tabelas que agrupam os valores obtidos em categorias que variam desde associações ausentes até perfeitas (tabela 1).

Tabela 1 - Alguns parâmetros para interpretação de tamanho de efeito ³⁸

FONTE	ESTATÍSTICA	VALOR	INTERPRETAÇÃO
Rea & Parker, 1992	<i>phi</i> ou “V” de Cramer	0,0 —0,1	Associação Insignificante
		0,1 —0,2	Associação Fraca
		0,2 —0,4	Associação Moderada
		0,4 —0,6	Associação Relativamente Forte
		0,6 —0,8	Associação Forte
		0,8 —1,0	Associação Muito Forte
Davis, 1971	Coeficientes de Correlação	≥7	Associação Muito Forte
		0,5 – 0,69	Associação Substancial
		0,3 – 0,49	Associação Moderada
		0,1 – 0,29	Associação Fraca
		0,01 – 0,09	Associação Insignificante
Hinkle, Wiersma & Jurs 1979	Coeficientes de Correlação	0,9 – 1,0	Correlação Muito Alta
		0,7 – 0,9	Correlação Alta
		0,5 – 0,7	Correlação Moderada
		0,3 – 0,5	Correlação Baixa
Hopkins 1997	Coeficientes de Correlação	0,9 – 1,0	Correlação Quase Perfeita
		0,7 – 0,9	Correlação Muito Grande
		0,5 – 0,7	Correlação Grande
		0,3 – 0,5	Correlação Moderada
		0,3 – 0,1	Correlação Pequena
		0,0 – 0,1	Correlação Praticamente Ausente

RESULTADOS

Este estudo avaliou amostras de tecido prostático em 101 procedimentos consecutivos de biópsias transretais com carcinoma da próstata, de 70 pacientes. A maioria dos pacientes (85,7%) tinha idade acima de 60 anos. Em 44, 28% dos pacientes, o nível sérico do PSA total estava entre 4,0 a 10,0 ng/ml. Dos 70 pacientes, 29 (41,4%) tinham escore 7 de Gleason. Foi excluído um caso devido à falta de carcinoma no corte histológico onde foi realizada a técnica de imuno-histoquímica para *p53*. As tabelas 2 e 3 descrevem as características clínicas e histopatológicas dos pacientes estudados.

Tabela 2 - Características descritivas dos pacientes com carcinoma de próstata (n=69)

Característica	Medida de sumário
Idade, anos	69,1±9,0
PSA sérico total, ng/ml	8,8 (6,4 – 20,1)
Escore de Gleason	6,6±0,7
Proporção de Carcinoma no total de tecido amostrado, %	27,3 (6,1 – 51,3)
Medida do maior eixo de tumor, mm	5,9 (2,5 – 10,0)

Os dados são apresentados como média±desvio padrão ou mediana (amplitude interquartil: P25 – P75). PSA: antígeno prostático específico.

Dos 69 pacientes estudados, 47,8% apresentaram positividade para *p53* e 26,1% foram positivos para o mesmo marcador quando foi utilizado o critério de positividade *em grupamento* (fig. 2). Quando, além da positividade para *p53*, foi avaliada a proporção de núcleos positivos para *p53*, os casos variaram entre nenhum núcleo positivo (0%) e 60% de núcleos positivos. Quanto à intensidade da positividade, os casos estudados obtiveram valores de zero a 3 (fig. 3, 4 e 5) A tabela 4 mostra as características descritivas das técnicas utilizadas para aferir a positividade imuno-histoquímica para *p53*.

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes segundo níveis de risco para recidiva bioquímica no carcinoma de próstata (n=69)³⁹

Nível de risco	f	%
Baixo: PSA ≤ 10 e Gleason ≤ 6	25	36,2
Intermediário: PSA 10 a 20 ou Gleason = 7	35	50,7
Alto: PSA > 20 ou Gleason ≥ 8	9	13,1

PSA: antígeno prostático específico (ng/ml).

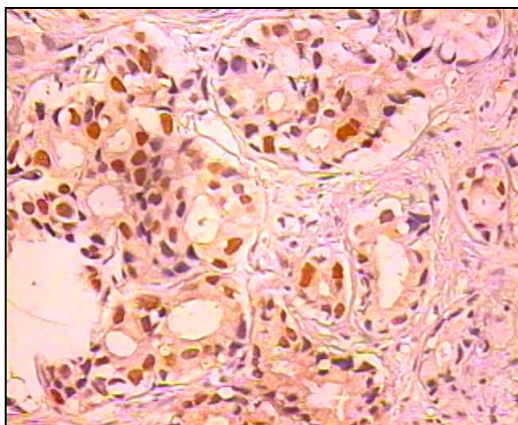


Fig. 2. Positividade *em grupamento* (15 ou mais núcleos corados – marrom – em campo de 400x) para *p53*.

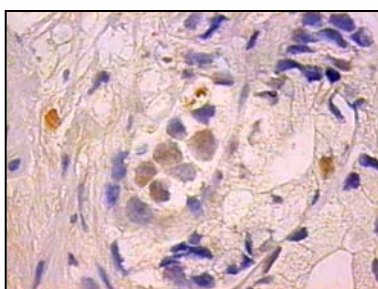


Fig. 3. *p53*+, intensidade 1.

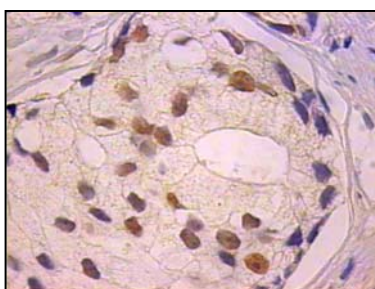


Fig. 4. *p53*+, intensidade 2.

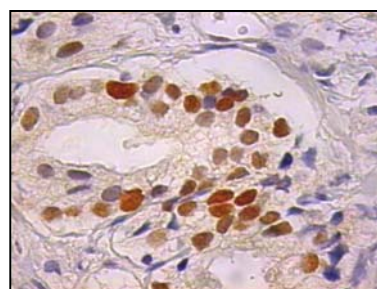


Fig. 5. *p53*+, intensidade 3.

Tabela 4 - Características descritivas das modalidades de aferição da imunorreatividade para *p53* (n=69)

Medida da expressão IHQ do <i>p53</i>	Medida de Sumário
<i>p53 em grupamento</i>	26,1%
<i>p53</i>	47,8%
<i>p53, intensidade da reação</i>	0 (0 – 1)
<i>p53, percentagem de núcleos positivos</i>	0 (0,0 – 7,5)

Os dados são apresentados como percentual de casos positivos na amostra ou mediana (amplitude interquartil: P25 – P75).

Intensidade da positividade para *p53*: 0=negativo, 1=positivo em intensidade fraca, 2=positivo em intensidade intermediária, 3=positivo em intensidade forte.

Dos 69 casos avaliados, 89,9% obtiveram escores de Gleason 6 ou 7. A tabela 5 mostra a distribuição dos escores de Gleason nos pacientes nos quais foi estudada a expressão da *p53*.

Entre as modalidades de determinação da imunorreatividade para *p53*, a positividade *em agrupamento* (*p53g*) apresentou os maiores valores de coeficiente de correlação (correlação positiva) quando testada frente ao valor do PSA e a características histológicas freqüentemente estudadas como fatores prognósticos e/ou preditivos no carcinoma prostático. Estes dados são apresentados na tabela 6. As correlações variaram entre muito fracas e moderadas.

Tabela 5 - Distribuição dos Escores de Gleason dos pacientes com carcinoma (n=69)

	Escore de Gleason				Total
	6	7	8	9	
n	32	30	6	1	69
%	46,4	43,5	8,7	1,4	100

Tabela 6 - Coeficiente de Correlação entre os métodos de aferição da imunorreatividade para *p53* e achados clínicos e histológicos dos pacientes com carcinoma prostático

Método de Aferição	Características					
	Clínicas n=68		Histológicas n=69			
	Idade	PSA	POC	>Eixo de tumor	IN (HE)	Gleason
<i>p53prop</i>	0,13 (0,29)	0,18 (0,14)	0,13 (0,30)	0,20 (0,10)	-0,11 (0,35)	0,18 (0,14)
<i>p53int</i>	0,07 (0,54)	0,11 (0,39)	0,15 (0,21)	0,18 (0,13)	-0,17 (0,16)	0,17 (0,15)
<i>p53</i>	0,03 (0,80)	0,18 (0,19)	0,18 (0,15)	0,19 (0,11)	-0,13 (0,27)	0,13 (0,28)
<i>p53g</i>	0,04 (0,76)	0,23 (0,06)	0,20 (0,09)	0,34 (<0,01)	0,11 (0,37)	0,23 (0,06)

Os dados estão apresentados como Coeficiente r_s de Spearman (valor p). PSA: antígeno prostático específico. *p53prop*: proporção(%) de células positivas. *p53int*: intensidade da positividade. *p53*: positividade em qualquer padrão. *p53g*: positividade *em agrupamento*. POC: proporção(%) objetiva de carcinoma. > Eixo de tumor: maior eixo de tumor na amostra. IN: invasão de nervo. HE: método da hematoxilina e eosina. Gleason: escore de Gleason.

Quando estudada a relação entre presença de invasão de nervos (fig. 6) e a positividade *em grupamento* para *p53*, encontrou-se associação tênue, sem significância estatística, quando a invasão de nervo(s) foi aferida pelo exame histológico convencional (HE). Utilizada a determinação de invasão de nervo(s) com o auxílio da reatividade para a proteína S100 por imuno-histoquímica (fig. 7 e 8), houve significância estatística e um aumento da faixa de magnitude no coeficiente *phi* (0,33; $p < 0,01$). Dos casos com invasão de nervo detectada no HE, 14,5% apresentaram positividade *em grupamento* para *p53*, contrastando com 23,2% de positividade para *p53 em grupamento* nos casos com invasão de nervos detectada com a utilização da demonstração imuno-histoquímica da proteína S100 (tabela 7).



Fig. 6. Invasão de nervo por carcinoma (H.E., 400x).

Tabela 7 - Coeficiente de concordância (*phi*) entre a imunorreatividade *em grupamento* para *p53* e presença de invasão neural por carcinoma prostático nos métodos HE e de imuno-histoquímica para a proteína S100. n=69

	n (%)	Presença de <i>p53 em grupamento</i>	<i>phi</i> *†	p*
Invasão de nervo - HE	32 (46,4)	10 (14,5)	0,11	0,36
Invasão de nervo - S100	43 (62,3)	16 (23,2)	0,33	<0,01

Os valores da coluna *p53 em grupamento* são apresentados como número de casos com presença concomitante da positividade para *p53 em grupamento* e presença de invasão de nervo (%). †Ver anexo 5 – magnitude das associações.

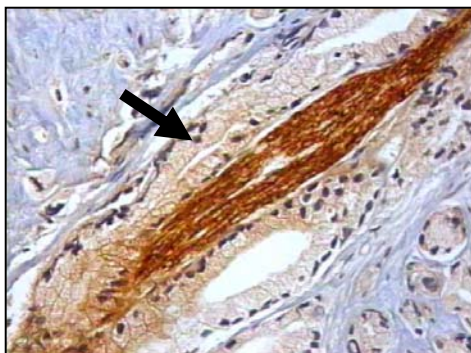


Fig. 7. Invasão de nervo por carcinoma (S100, 400x).

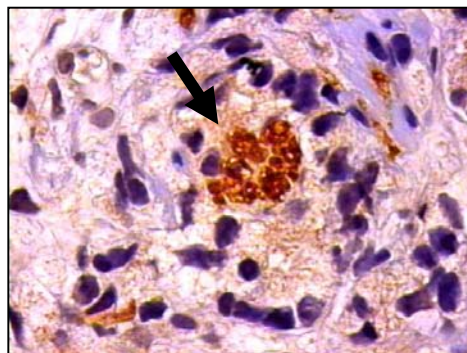


Fig. 8. Invasão de nervo por carcinoma (S100, 1000x).

Em relação aos critérios morfológicos utilizados para o diagnóstico de carcinoma prostático, encontraram-se associações estatisticamente significativas entre a positividade *em grupamento* para *p53* e a presença de fibroplasia mucinosa (micronódulos de colágeno) (fig. 9) e presença de mais de um nucléolo proeminente em um mesmo núcleo (fig. 10) das células de carcinoma ($p < 0,01$). Os dados relativos aos critérios morfológicos estão apresentados nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Frequência de critérios diagnósticos nos carcinomas prostáticos (n=69) e relação com a imunoreatividade *em grupamento* para *p53*, parte I

Crítérios	Frequência relativa -%	<i>p53 em grupamento</i> n (%)	<i>phi</i> *	p*
Nucleares				
Nucléolos Proeminentes	97,1	18(26,1)	0,10	0,40
Mais de um (1) Nucléolo Proeminente em um Núcleo	55,1	16(23,2)	0,40	<0,01
Aumento do Tamanho Nuclear (n=67) [†]	73,1	13(19,4)	0,04	0,72
Hipercromasia Nuclear (n=67) [†]	58,2	12(17,9)	0,15	0,23

continua...

continuação...

Critérios	Frequência relativa -%	p53 em grupamento n (%)	phi *	p*
Citoplasmáticos				
Anofilia	53,6	11(15,9)	0,09	0,46
Citoplasma Amplo [‡]	28,4	7(10,4)	0,17	0,17
Secreção Intraluminal				
Eosinofílicas				
Grumosa	91,3	16(23,2)	-0,05	0,67
Concêntrica	18,8	4(5,8)	0,05	0,67
Sem outra especificação	8,7	3(4,3)	0,17	0,16
Cristalóides	31,9	7(10,1)	0,09	0,46
Basofílica				
Mucínosa	72,5	15(21,7)	0,14	0,23

Os valores da coluna *p53 em grupamento* são apresentados como número de casos com presença concomitante da positividade para *p53 em grupamento* e o achado morfológico – critério – indicado na primeira coluna(%).

[‡]Foram excluídos casos onde não houve célula epitelial benigna na amostra para comparação.

Phi: medida de associação para duas variáveis dicotômicas.

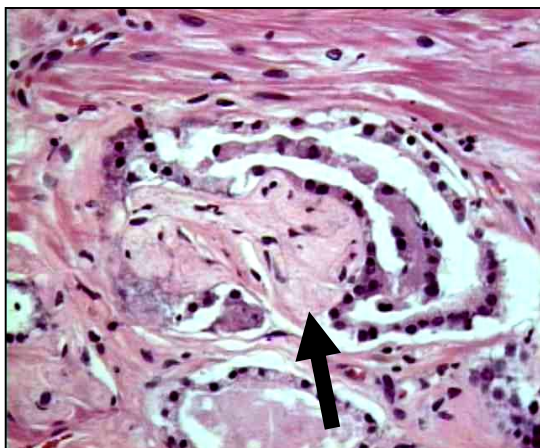


Fig. 9. Fibroplasia mucinosa (micronódulos de colágeno)(H.E. 400x).

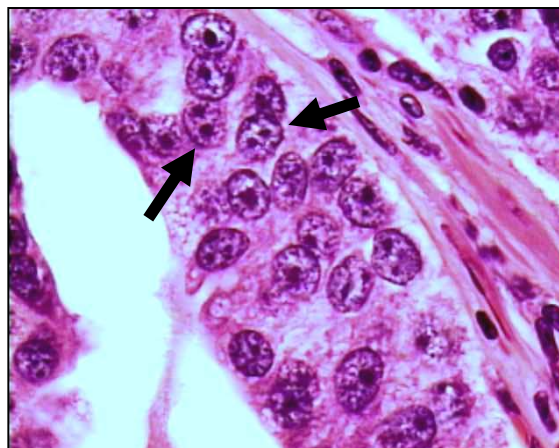


Fig. 10. Mais de um nucléolo proeminente por núcleo de célula de carcinoma (H.E. 1000x).

Tabela 9: Frequência de critérios diagnósticos nos carcinomas prostáticos (n=69) e relação com a imunorreatividade *em grupamento* para *p53*, parte II

Crítérios	Frequência relativa (%)	<i>p53 em grupamento</i> n (%)	<i>phi</i>*	<i>p</i>*
Arquiteturais e Estromais ^a				
Glândulas orientadas em eixos perpendiculares entre si	88,4	15(83,3)	-0,09	0,43
Ácinos pequenos e regulares em meio a ácinos normais	84,1	16(23,2)	0,08	0,51
Desmoplasia	21,7	6(8,7)	0,17	0,16
Outros				
Figura(s) de mitose	4,3	2(2,9)	0,20	0,10
Fibroplasia Mucinosas [¶]	7,2	4(5,8)	0,34	<0,01
Extensão Extra-Prostática [¶]	5,8	1(1,4)	0,00	0,96
Formações Glomerulóides	18,8	5(27,8)	0,14	0,26
NIP de Alto Grau associada	31,9	8(11,6)	0,16	0,18

Os valores da coluna *p53 em grupamento* são apresentados como número(%) de casos com presença concomitante da positividade para *p53 em grupamento* e o achado morfológico – critério – indicado na primeira coluna.

^a Exceto invasão de nervos.

[¶] Micronódulos de colágeno.

[¶] Identificada através do achado de infiltração de tecido adiposo.

Phi: medida de associação para duas variáveis dicotômicas.

NIP: neoplasia intraepitelial prostática.

DISCUSSÃO

A determinação imuno-histoquímica da superexpressão da *p53* associa-se a mau prognóstico em carcinomas prostáticos.

A presença da superexpressão imuno-histoquímica para *p53* é mais freqüente em carcinomas originados na zona periférica do que nos da zona de transição. Estes últimos costumam apresentar escores de Gleason mais baixos e serem menos agressivos.⁴⁰

No nosso estudo, encontramos 47,8% de positividade para *p53* sem outras especificações e 26% de positividade *grupamento* para o mesmo marcador. A literatura apresenta freqüências entre 6%, nos carcinomas de baixo grau⁴¹, e 80%, quando qualquer quantidade de positividade é encontrada em peças cirúrgicas⁴², sendo evidente uma grande variabilidade dependente de tipo de material examinado e método de aferição da imunorreatividade. Em biópsias, encontramos na literatura freqüências entre 18% e 66%.^{33,36}

A determinação *em grupamento* da expressão imuno-histoquímica da *p53* mostrou-se, no presente estudo, superior às demais formas de categorizar como positiva a imunorreatividade para o produto do gene. Mesmo com uma magnitude não muito superior, relacionou-se com mais força com o valor do PSA e com os achados freqüentemente mencionados nos laudos anatomopatológicos que têm valor preditivo, independente ou não, para eventos adversos no seguimento dos pacientes com carcinoma prostático. Houve significância estatística da correlação com o maior eixo de tumor nas amostras ($p < 0,01$) e uma tendência à significância estatística quando estudados o escore de Gleason ($p = 0,06$) e o valor do PSA sérico ($p = 0,06$).

Pelos resultados deste estudo, pela não alteração nos custos do exame e por não haver aumento significativo no tempo e na dificuldade relacionados especificamente com este tipo de aferição quando comparado aos outros métodos testados, não hesitamos em

recomendá-lo como um dos métodos de escolha em biópsias. Estes achados estão em concordância com os de Yang e colaboradores⁴³ que, de forma pioneira, sugerem esta modalidade para o estudo imuno-histoquímico da mutação do *TP53* no câncer de próstata. Uma explicação para esta provável especificidade maior para identificar a mutação reside no fato de que é muito pouco provável que a expressão de uma proteína, que em situações normais tem uma meia vida curta, seja detectada simultaneamente em 15 núcleos dentro de um mesmo campo de grande aumento de microscopia (400x).

O estadiamento pré-operatório do carcinoma da próstata é baseado no toque retal, no PSA sérico, nos achados histopatológicos da biópsia e em exames de imagem. O toque retal, freqüentemente, subestima a extensão do tumor e os exames de imagem acrescentam pouco para a acurácia do estadiamento pré-operatório. A interpretação pré-operatória do PSA sérico é confundida pela hiperplasia nodular da próstata e pelo grau de diferenciação do tumor.³⁹ Portanto o PSA sérico não é suficientemente adequado para predizer estadiamento patológico final em um indivíduo com doença localizada. O escore de Gleason na biópsia é fortemente associado com estadiamento patológico final para pacientes que apresentam escores extremos (escores de 2 a 4 e de 8 a 10)²⁸. Entretanto, grande parte dos pacientes com carcinoma da próstata apresenta escores de Gleason 6 e 7, valores que não são bons preditores de estadiamento patológico. Na nossa amostra, de 69 pacientes, 89,9% apresentaram escores de Gleason 6 e 7.

Com relação ao *TP53*, há virtualmente um consenso ao afirmar que o funcionamento defeituoso do mesmo, que pode ser expresso na demonstração imuno-histoquímica da superexpressão da proteína *p53*, correlaciona-se com perfil mais agressivo da doença. A controvérsia é se a determinação da mutação por este método tem poder preditivo

independente, principalmente se examinada em biópsias, quando comparada a fatores prognósticos clássicos como, por exemplo, o escore de Gleason e valor do PSA sérico. Novos estudos, incluindo também outros métodos de estudo do gene, ainda são necessários. A falta de padronização que seja universalmente utilizada para o ponto de corte na quantificação de núcleos positivos que representaria melhor a presença da mutação, ou que indique os casos de pior prognóstico, pode ser em parte responsável pela controvérsia. Em algumas situações específicas, como a que se refere ao tratamento radioterápico, parece haver uma possibilidade mais forte de utilização clínica, uma vez que casos com a mutação responderiam menos ao efeito pró-apoptose deste tratamento.^{36,44,45}

A invasão neural pelo carcinoma da próstata na biópsia, como variável preditora para estadiamento tumoral, tem sido examinada por vários estudos. Entretanto, o valor preditivo positivo encontrado é muito variado. A frequência de invasão neural varia nos estudos entre 11 e 38%, logo não é surpreendente que existirão diferenças entre os mesmos quanto à especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.²⁶ A invasão neural é um critério diagnóstico de carcinoma prostático e pode ter valor preditivo nesta doença. A técnica da imuno-histoquímica com S-100 permite a detecção de nervos invadidos de menor diâmetro, os quais dificilmente são detectados nas lâminas coradas pelo HE. O estudo de Litvin e colaboradores²⁶, com amostragem de casos 70 pacientes, comparou, em punção-biópsia da próstata com carcinoma, a técnica do HE com a imuno-histoquímica da proteína S-100, método mais sensível para identificar nervos.

O presente estudo utilizou os mesmos casos do estudo de Litvin, exceto por um, que foi excluído devido ao desaparecimento do carcinoma prostático no corte histológico destinado à realização da técnica de imuno-histoquímica para o produto *p53*. Esta perda

deve-se ao fato de que, com o aprofundamento do nível de secção do bloco de parafina para se obter mais um corte histológico, foi obtida uma amostra de tecido (novo corte) sem neoplasia. Este evento não é infrequente na rotina diagnóstica da anatomia patológica.

Litvin, nos 70 pacientes avaliados, encontrou 31 (44,3%) pacientes com invasão de nervo pelo carcinoma no HE e 43 (61,4%) com invasão de nervo com a técnica imuno-histoquímica para a proteína S-100 ($p < 0,001$). Estes achados são expressivos, pois diferem consideravelmente das informações encontradas na literatura. Esta diferença estatisticamente significativa manteve-se na amostra do presente estudo (com um paciente a menos), que para os mesmos achados, apresentou frequências semelhantes (respectivamente 46,4% *versus* 62,3%).

A associação moderada dos achados de imunorreatividade *em grupamento* para *p53* com a invasão de nervos, quando esta é identificada com o auxílio da imuno-histoquímica para a proteína S100, contrasta com a associação fraca, sem significância estatística, quando a presença de invasão de nervos é determinada pelo exame histológico convencional (HE).

Como, de acordo com o estudo de Litvin, os nervos invadidos que são detectados apenas na técnica do S100 são os de menor tamanho, pode-se concluir que a invasão destes nervos de menor tamanho é responsável pelas diferenças encontradas quando a comparamos (técnica da S100) com o HE, no que se refere à imunorreatividade para *p53*, ou seja, quando há invasão de nervos pequenos que normalmente passam despercebidos na histologia convencional, há uma maior chance de estarmos frente a um caso com

positividade imuno-histoquímica para a proteína *p53* e a uma provável mutação do gene *TP53*.

O mecanismo classicamente proposto para a invasão de nervos por carcinoma é que, nos trajetos de nervos, existe uma condição de menor pressão^{6,24,46,47}, logo, os carcinomas teriam uma via de crescimento e disseminação facilitada. É possível que, nos nervos pequenos, a infiltração por carcinoma não seja facilitada da mesma maneira por este mecanismo.

Algumas evidências apontam que invasão neural pelo carcinoma da próstata não parece ser um efeito somente de volume tumoral e pressão reduzida no trajeto de nervos, pois carcinomas pequenos também podem apresentar invasão de nervo. Yang e colaboradores²⁷ relataram que o componente neural favorece o crescimento da neoplasia inibindo a apoptose, o que facilitaria a disseminação do carcinoma através dos nervos, mesmo em carcinomas considerados pequenos.

Como o *TP53* normal tem múltiplas funções conhecidas na proteção ao desenvolvimento de tumores e na progressão destes, é possível que os subclones onde exista mutação deste no carcinoma prostático obtenham favorecimento para o desenvolvimento de outras mutações, entre estas, alguma(s) que favoreça(m) maior potencial de infiltração da neoplasia, permitindo a invasão de nervos por mecanismo(s) diverso(s) da facilidade concedida por ambiente de menor pressão presente no trajeto dos mesmos. Além disto, um dos mecanismos de inibição da apoptose em tumores é a disfunção do *TP53*.

Estes achados estimulam o estudo da invasão de nervos como fator prognóstico/preditivo no nosso meio, devido à alta frequência deste evento nos casos estudados tanto com a histologia convencional (HE), quanto nos casos examinados com a proteína S100, onde a frequência é ainda maior e são encontrados nervos de menor tamanho. Reforçam também o estímulo à pesquisa de outros fatores relacionados diretamente com a invasividade dos tumores, como moléculas de adesão intercelular e moléculas relacionadas com a digestão do estroma para explicar um possível mecanismo particular responsável pela invasão de nervos pequenos, conforme sugerido pela mais alta frequência de superexpressão imuno-histoquímica da *p53* nas lesões com este achado.

Outras associações estatisticamente significativas com a imunorreatividade *em grupamento* para *p53* foram as presenças de mais de um nucléolo proeminente em um mesmo núcleo de célula de carcinoma (magnitude relativamente forte) e de micronódulos de colágeno (magnitude moderada).

Mais de um nucléolo proeminente por núcleo foi um achado identificado em 55,1% da nossa amostra. No estudo de Varma e colaboradores que estudou critérios morfológicos diagnósticos em carcinomas prostáticos, este achado apareceu em 64% dos casos. Como nucléolos relacionam-se com síntese protéica⁴⁸, logo, casos com mutação de um gene (*TP53*) que suprime tumores pelos mecanismos anteriormente expostos, apresentariam uma atividade de síntese protéica aumentada.

Os micronódulos de colágeno são classicamente definidos como uma reação do estroma prostático ao extravasamento de secreção mucosa dos ácinos malignos.^{16,49} No referido estudo, não foi encontrado resquício de muco nestas estruturas. Este achado

(micronódulos de colágeno) é infreqüente no carcinoma prostático (0,1-2%)^{19-22,49}, sendo considerado patognomônico do tumor, pois o tecido benigno da próstata, nas séries estudadas^{19,21,49,50}, nunca apresentou este tipo de alteração. No nosso estudo, foi identificada uma freqüência maior deste achado (7,2%). O motivo da maior freqüência e da associação encontrada carece de um modelo teórico que a explique, sendo necessários novos estudos para confirmação e melhor esclarecimento deste achado.

CONCLUSÕES

Achados morfológicos associados à superexpressão da *p53*: micronódulos de colágeno e mais de um nucléolo proeminente no mesmo núcleo de célula de carcinoma prostático, em biópsias, mostram-se como variáveis histológicas promissoras para estudos de determinação de prognóstico nesta doença.

A invasão de nervos, apenas quando detectada com o auxílio da técnica de imuno-histoquímica para a proteína S100, associa-se positivamente com a determinação imuno-histoquímica de superexpressão da *p53*.

A invasão de nervos detectada pelo S100, principalmente quando de pequeno tamanho, constitui-se em um modelo experimental interessante para estudar características biológicas e clínicas dos tumores prostáticos.

A aferição da positividade imuno-histoquímica para *p53*, de padrão *em grupamento*, apresentou maiores valores de medidas de correlação e associação com o valor do PSA sérico, proporção de tumor no total de tecido amostrado, medida do maior eixo de tumor nas amostras, escore de Gleason e presença de invasão de nervos nos carcinomas

prostáticos diagnosticados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, quando comparada às demais modalidades testadas, em material de punção-biópsia transretal.

REFERÊNCIAS

1. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 2000;21(6):167-223.
2. Passaglia LMP. Mutação, mecanismos de reparo do DNA e recombinação. In: Zaha A. ed. *Biologia Molecular Básica*. Porto Alegre, Mercado Aberto; 1996. p. 116-134.
3. Liu Y, Kulesz-Martin M. p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding. *Carcinogenesis* 2001;22(6):851-860.
4. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. *Robbins & Cotran Patologia. Bases patológicas das doenças*. Rio de Janeiro, Elsevier; 2005. p. 300-333.
5. Leibovich BC, Cheng L, Weaver AL, Myers RP, Bostwick DG. Outcome prediction with p53 immunostaining after radical prostatectomy in patients with locally advanced prostate cancer. *J Urol* 2000;163(6):1756-1760.
6. Majno G, Joris I. Antitumor defenses. In: Majno G, Joris I. *Cells, tissues, and disease : principles of general pathology*. Cambridge, Mass., Blackwell Science; 1996. p. 885-895.
7. Stackhouse GB, Sesterhenn IA, Bauer JJ, Mostofi FK, Connelly RR, Srivastava SK, et. al. p53 and bcl-2 immunohistochemistry in pretreatment prostate needle biopsies

- to predict recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 1999;162(6):2040-2045.
8. Shurbaji MS, Kalbfleisch JH, Thurmond TS. Immunohistochemical detection of p53 protein as a prognostic indicator in prostate cancer. *Hum Pathol* 1995;26(1):106-109.
 9. Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi KF, McLeod DG, Srivastava S, Moul JW. p53 nuclear protein expression is an independent prognostic marker in clinically localized prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 1995;1(11):1295-1300.
 10. Borre M, Stausbol-Gron B, Overgaard J. p53 accumulation associated with bcl-2, the proliferation marker MIB-1 and survival in patients with prostate cancer subjected to watchful waiting. *J Urol* 2000;164(3 Pt 1):716-721.
 11. Eastham JA, Stapleton AM, Gousse AE, Timme TL, Yang G, Slawin KM, et. al. Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1995;1(10):1111-1118.
 12. Quinn DI, Henshall SM, Head DR, Golovsky D, Wilson JD, Brenner PC, et. al. Prognostic significance of p53 nuclear accumulation in localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Cancer Res* 2000;60(6):1585-1594.
 13. Epstein JI, Algaba F, Allsbrook Jr. WC, Bastacky, S, Boccon-Gibod L, De Marzo AM, Egevad L, et. al. Tumors of the prostate. In: Eble JN, ed. *Pathology and*

- Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Oxford, Oxford University Press; 2004. p. 159-192.
14. Bostwick DG. Neoplasms of the prostate. In: Bostwick DG, Eble JN eds. Urologic surgical pathology. St. Louis, Mosby-Year Book; 1997. p. 343-442.
 15. Young RH, Srigley JR, Amin MB, Ulbright TM, Cubilla AL: Carcinoma of the prostate gland. In: Young RH, ed. Tumors of the prostate gland, seminal vesicles, male urethra, and penis. Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology . American Registry of Pathology Armed Forces Institute of Pathology; 2000. p. 111-199.
 16. Epstein JI, Yang XJ. Diagnosis of limited adenocarcinoma of the prostate. In: Epstein JI, Yang XJ, eds. Prostate biopsy interpretation. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 64-91.
 17. Bostwick DG, Dundore PA. Adenocarcinoma. In: Biopsy pathology of the prostate. Bostwick DG, Dundore PA, eds. London ; New York, Chapman & Hall Medical; 1997. p. 107-140.
 18. Coelho GP, Litvin IE, Guerreiro V, Almanza AA, Edelweiss MIA. Prevalência dos critérios diagnósticos em carcinoma prostático: um estudo de base populacional. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003;39(Suplemento Científico do XXIV Congresso Brasileiro de Patologia):101.

19. Baisden BL, Kahane H, Epstein JI. Perineural invasion, mucinous fibroplasia, and glomerulations: diagnostic features of limited cancer on prostate needle biopsy. *Am J Surg Pathol* 1999;23(8):918-924.
20. Epstein JI. Diagnosis and reporting of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Mod Pathol* 2004;17(3):307-315.
21. Varma M, Lee MW, Tamboli P, Zarbo RJ, Jimenez RE, Salles PG, et. al. Morphologic criteria for the diagnosis of prostatic adenocarcinoma in needle biopsy specimens. A study of 250 consecutive cases in a routine surgical pathology practice. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126(5):554-561.
22. Arangelovich V, Tretiakova M, SenGupta E, Krausz T, Yang XJ. Pathogenesis and significance of collagenous micronodules of the prostate. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003;11(1):15-19.
23. Epstein JI. Diagnostic criteria of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Hum Pathol* 1995;26(2):223-229.
24. Villers A, McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. The role of perineural space invasion in the local spread of prostatic adenocarcinoma. *J Urol* 1989;142(3):763-768.
25. Mc Neal JE. Anatomy of the prostate: implications for disease. In: Bostwick DG, ed. *Pathology of the prostate*. New York, Churchill Livingstone; 1990. p. 1-14.

26. Litvin IE. Invasão de nervos pelo carcinoma da próstata em biópsias transretais. [Dissertação de Mestrado] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre; 2004.
27. Yang G, Wheeler TM, Kattan MW, Scardino PT, Thompson TC. Perineural invasion of prostate carcinoma cells is associated with reduced apoptotic index. *Cancer* 1996;78(6):1267-1271.
28. Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond ME, Amin MB, Cohen M, Crawford D, et al. Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):995-1000.
29. Egan AJ, Bostwick DG. Prediction of extraprostatic extension of prostate cancer based on needle biopsy findings: perineural invasion lacks significance on multivariate analysis. *Am J Surg Pathol* 1997;21(12):1496-1500.
30. O'Malley KJ, Pound CR, Walsh PC, Epstein JI, Partin AW. Influence of biopsy perineural invasion on long-term biochemical disease-free survival after radical prostatectomy. *Urology* 2002;59(1):85-90.
31. de la Taille A, Katz A, Bagiella E, Olsson CA, O'Toole KM, Rubin MA. Perineural invasion on prostate needle biopsy: an independent predictor of final pathologic stage. *Urology* 1999;54(6):1039-1043.
32. de la Taille A, Rubin MA, Bagiella E, Olsson CA, Buttyan R, Burchardt T, et al. Can perineural invasion on prostate needle biopsy predict prostate specific antigen recurrence after radical prostatectomy? *J Urol* 1999;162(1):103-106.

33. Oxley JD, Winkler MH, Parry K, Brewster S, Abbott C, Gillatt DA. p53 and bcl-2 immunohistochemistry in preoperative biopsies as predictors of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *BJU Int* 2002;89(1):27-32.
34. Karaburun Paker S, Kilicarslan B, Ciftcioglu AM, Oztekin S, Sargin FC, Erdogru T, et. al. Relationship between apoptosis regulator proteins (bcl-2 and p53) and Gleason score in prostate cancer. *Pathol Oncol Res* 2001;7(3):209-212.
35. Brewster SF, Oxley JD, Trivella M, Abbott CD, Gillatt DA. Preoperative p53, bcl-2, CD44 and E-cadherin immunohistochemistry as predictors of biochemical relapse after radical prostatectomy. *J Urol* 1999;161(4):1238-1243.
36. Grignon DJ, Caplan R, Sarkar FH, Lawton CA, Hammond EH, Pilepich MV, et. al. p53 status and prognosis of locally advanced prostatic adenocarcinoma: a study based on RTOG 8610. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(2):158-165.
37. Moul JW, Bettencourt MC, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG, Srivastava S, et. al. Protein expression of p53, bcl-2, and KI-67 (MIB-1) as prognostic biomarkers in patients with surgically treated, clinically localized prostate cancer. *Surgery* 1996;120(2):159-166; discussion 166-157.
38. Kotrlik JW, Williams HA. The Incorporation of Effect Size in Information Technology, Learning, and Performance Research. *Information Technology, Learning, and Performance Journal* 2003;21(1):1-7.

39. Partin AW, Yoo J, Carter HB, Pearson JD, Chan DW, Epstein JI, et. al. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol* 1993;150(1):110-114.
40. Erbersdobler A, Fritz H, Schnoger S, Graefen M, Hammerer P, Huland H, et. al. Tumour grade, proliferation, apoptosis, microvessel density, p53, and bcl-2 in prostate cancers: differences between tumours located in the transition zone and in the peripheral zone. *Eur Urol* 2002;41(1):40-46.
41. Haussler O, Epstein JI, Amin MB, Heitz PU, Hailemariam S. Cell proliferation, apoptosis, oncogene, and tumor suppressor gene status in adenosis with comparison to benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, and cancer. *Hum Pathol* 1999;30(9):1077-1086.
42. Stricker HJ, Jay JK, Linden MD, Tamboli P, Amin MB. Determining prognosis of clinically localized prostate cancer by immunohistochemical detection of mutant p53. *Urology* 1996;47(3):366-369.
43. Yang G, Stapleton AM, Wheeler TM, Truong LD, Timme TL, Scardino PT, et. al. Clustered p53 immunostaining: a novel pattern associated with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 1996;2(2):399-401.
44. Ritter MA, Gilchrist KW, Voytovich M, Chappell RJ, Verhoven BM. The role of p53 in radiation therapy outcomes for favorable-to-intermediate-risk prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53(3):574-580.

45. Scherr DS, Vaughan ED, Jr., Wei J, Chung M, Felsen D, Allbright R, et. al. BCL-2 and p53 expression in clinically localized prostate cancer predicts response to external beam radiotherapy. *J Urol* 1999;162(1):12-16; discussion 16-17.
46. Rodin AE, Larson DL, Roberts DK. Nature of the perineural space invaded by prostatic carcinoma. *Cancer* 1967;20(10):1772-1779.
47. Hassan MO, Maksem J. The prostatic perineural space and its relation to tumor spread: an ultrastructural study. *Am J Surg Pathol* 1980;4(2):143-148.
48. Junqueira LC. O núcleo celular. In: Junqueira LC, Carneiro J, eds. *Histologia Básica*. 10º ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan; 2004. p. 52-66.
49. Bostwick DG, Wollan P, Adlakha K. Collagenous micronodules in prostate cancer. A specific but infrequent diagnostic finding. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119(5):444-447.
50. Thorson P, Vollmer RT, Arcangeli C, Keetch DW, Humphrey PA. Minimal carcinoma in prostate needle biopsy specimens: diagnostic features and radical prostatectomy follow-up. *Mod Pathol* 1998;11(6):543-551.

**RELATIONSHIP BETWEEN HISTOLOGICAL DIAGNOSTIC
CRITERIA AND THE IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION
OF P53 IN PROSTATIC CARCINOMA**

Coelho GP[§], Litvin IE*, Edelweiss MIA[†]

[§] Pathologist, currently taking MSc at Postgraduate Course in Medical Sciences: Surgery, School of Medicine, UFRGS, Brazil.

* Pathologist, MSc of the Postgraduate Course in Medical Sciences: Surgery, School of Medicine, UFRGS.

[†] Pathologist, PhD, Associate Professor in the Department of Pathology at the Medical School, UFRGS.

Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence to: Guilherme Portela Coelho
Rua Os Dezoito do Forte, 1544/902
95020-472 – Caxias do Sul, RS – Brazil
e-mail: gcoelho@terra.com.br

ABSTRACT

Background: *TP53* is the single most common target of mutation in human tumors. It is involved in the blockage of the cell cycle, DNA repair, cell differentiation and apoptosis, in response to genetic damage. Immunohistochemistry (IHC) can detect the accumulation of the *p53* protein in the cell nucleus, indicating mutation. This finding has been associated with aggressive behavior in prostatic carcinomas. Knowing the histological characteristics of this carcinoma allows pathologic diagnostic criteria and grading systems to provide better care to patients who have this disease. The study of the relationship between molecular biology findings and the histological characteristics of this neoplasm leads to greater knowledge of the mechanisms that produce morphological changes in tissue, helping to identify promising new variables to determine the biological behavior of the disease.

Methods: samples of 101 needle biopsies of the prostate were examined, from seventy patients with prostatic carcinoma, in sections stained with hematoxylin and eosin (HE), selected from 500 consecutive examinations. New sections were obtained from the same paraffin blocks and were immunostained using the monoclonal antibody DO7 for *p53*, in 69 of the patients. For purposes of the association analysis, the morphological findings, the pattern of immunostaining for *p53*, the presence of perineural invasion (by HE and IHC staining for S100 protein) and some clinical and laboratory characteristics of patients with prostatic carcinoma were noted.

Results: among the ways used to measure IHC positivity for the *p53*, clustered immunostaining was best correlated with the clinicopathologic findings examined: serum PSA, Gleason score, amount of tumor in the sample ($p < 0.01$) and the presence of perineural invasion (PNI). Of the diagnostic criteria, there was a statistically significant association of clustered *p53* immunostaining with the presence of collagen micronodules and the finding of more than one prominent nucleolus in the same nucleus of neoplastic cell. Statistically significant association also occurred when PNI was identified with S100 protein.

Conclusion: clustered *p53* immunostaining was better correlated than other staining patterns, when compared to the pathologic findings with prognostic value in biopsies and with the serum PSA. The statistically significant association of clustered *p53* immunostaining and the presence of PNI detected with the use of S100 protein contrasts with the absence of significance when PNI was identified in conventional histology (HE). New studies are recommended to verify the usefulness of IHC detection of PNI in the prognosis of the disease and to identify the molecular mechanism of invasion of small nerves that are not easily identified in HE. The presence of the association of IHC positivity for *p53* with collagen micronodules also recommends new clinical and molecular studies to account for the relationship between this histological finding and the biological behavior of prostatic carcinoma.

Key words: prostatic carcinoma, *TP53*, S100, immunohistochemistry, histology, histopathology, diagnostic criteria, needle biopsy.

BACKGROUND

Non-lethal damage to DNA is at the heart of carcinogenesis. This damage may be acquired through the action of chemical, physical and/or biological agents.¹⁻³ The genetic hypothesis is founded on the premise that tumors are clonal expansion of a single cell that has suffered damage to its genetic material.⁴

Gene *p53* or *TP53* is one of the most studied cancer-related genes. It codifies a 53kD protein with the same name, protein *p53*, which is responsible for its biological function.⁵ It is located in chromosome 17p13.1 and it is the single most common target of mutation in human tumors.^{4,6-9} More than 70% of human tumors contain some defect in this gene and a large part of those who do not present this defect have others in genes that influence its expression.⁴ Its normal activities include: a) temporarily stopping the cell cycle prolonging G1, between mitosis and the synthesis, promoting additional time for to DNA repair; b) triggering apoptosis in the cell also in response to DNA damage; c) stimulating the transcription of genes related to tissue differentiation, sending the cell in the direction opposite of carcinogenesis.^{4,5,7,9-12}

Prostatic adenocarcinomas vary from cancers forming well-differentiated glands, which may be difficult to define as carcinoma, to poorly differentiated tumors, in which it may be difficult to determine that the cancer is prostatic in origin. A common characteristic is the absence of basal cells contrasting with benign prostatic epithelium.¹³⁻¹⁵

The diagnosis of prostatic carcinoma depends on recognizing a large amount of tissue characteristics which may be architectural, nuclear, cytoplasmatic or intraluminal.¹³⁻

18

The findings of glomerulations, mucinous fibroplasia (or collagen micronodules) and perineural invasion are considered specific for carcinoma because they have not been

described in benign glands.¹⁹⁻²¹ Glomerulations are acini with luminal proliferations of cells in a cribriform conformation, apparently adhering to a point of the “wall” of the same acinus, recalling a glomerular (renal) structure. Mucinous fibroplasia is characterized by fibrous tissue with low cellularity, in the form of small nodules, possibly corresponding to a stromal reaction classically attributed to extravasation of mucoid luminal content from malignant acini. The study by Arangelovich et. al.²² which analyzed these structures ultra-structurally, mentions that they are constituted by fragmented collagen bands enveloped in material similar to the basal membrane. In the aforementioned study, no mucus residue was found in these structures. Perineural invasion is a specific finding as long as it is differentiated from the indentation of nerves by benign or malignant glands, a factor which may confound the observer.^{15-17,19,23}

It is believed that perineural invasion is the pathway for the extraprostatic dissemination of carcinoma²⁴. McNeal et. al.²⁵ demonstrated that 85% of the cases of capsular penetration are related to perineural invasion. Neural invasion by prostatic carcinoma is not only an effect of tumor volume, since small carcinomas may also present neural invasion²⁶. Yang et. al.²⁷ report that the neural component favors neoplasm growth inhibiting apoptosis, which would make it easier for the carcinoma to be disseminated through the nerves, even in lesions considered small. The value of identifying neural invasion is controversial as an independent predictive factor in multivariate analyses²⁸⁻³², after considering the Gleason score, preoperative serum PSA and amount of tumor found at biopsy.

The demonstration of immunohistochemical expression of molecular markers as prognostic factors has not yet proved clearly useful in helping patients with prostatic carcinoma. Studies with needle biopsies are conflicting as regards the capacity of

immunoreactivity for *p53* to determine a prognosis before treatment.^{7,33-36} In this kind of material, many studies show a positive correlation between the overexpression of this protein and the biological behavior of prostatic carcinoma, sometimes independently of classical prognostic factors.^{5,10,12,37} However, very probably due to its low specificity³³ and to the methodological issues involved in the indirect determination of *TP53* mutation, this finding does not yet appear useful in patient care.

METHODS

The present study evaluated 70 patients with carcinoma submitted to transrectal needle biopsy of the prostate during a six-month period, performed by the Urology Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. These cases were selected from 500 consecutive needle biopsies, 101 of which (from 70 patients) presented prostatic carcinoma. This study did not define a single physician to perform the biopsies, nor a standardized technique.

The fragments biopsied were sent to the Pathology Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre and processed. The immunohistochemical technique was performed at the Center of Experimental Research at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

The following were excluded: cases of needle biopsy without carcinoma, atypical small acinar proliferations (ASAP), and cases diagnosed as carcinoma at histological examination by HE staining, which presented loss of tissue in the new sections made for the immunohistochemistry technique in an amount sufficient for the tumor not to be morphologically identified in these new sections.

After consulting the medical history of the patients, parameters before the biopsy, such as age of the patient and total serum PSA were analyzed.

All the biopsies were fixed in 10% buffered formalin and paraffin embedded. The paraffin blocks containing the embedded tissues were cut with the steel blade of the microtome, obtaining sections about 5 μm (5 micrometers = 0.005 millimeters) thick. The slides prepared were stained using the hematoxylin-eosin (HE) method. In a second stage, the same paraffin blocks were once again cut in the microtome, obtaining new sections about 5 μm thick. These were stained using the immunohistochemical technique (streptavidin-biotin-peroxidase complex), with the antibody for protein *p53* (Dako®, mouse anti-human, monoclonal, DO-7 clone, dilution: 1:100), which recognizes both the mutant forms and the normal or “wild-type” form of *p53*. Sections of breast tumor tissue, known to be positive to the reaction were used as a positive control for the entire battery of tests. In order to study perineural invasion, histological sections were also immunohistochemically stained using the polyclonal antibody for S100 protein (Novocastra®, liquid polyclonal, dilution: 1:200). Sections of intestinal tissue (myoenteric nervous plexus) were used as positive control for the battery of tests.

All of the biopsies were evaluated simultaneously by two pathologists and disagreements were resolved by consensus.

Initially all biopsies stained with HE were studied, and in a second stage, at a minimum interval of six months, all the biopsies stained by immunohistochemistry for S100 and for *p53* were observed.

A Zeiss optical microscope, Standard 20 model, with four objective lenses (2.5x, 20x, 40x and 100x) and a 10x magnification ocular was used. The microscopy field diameter with the 400 objective lens is 0.4 mm.

The extent of the fragments was measured with the naked eye using a millimetered ruler placed on the glass slide. The thickness of the largest fragment was obtained in standard units of an instrument called Ocular Measurement Reticulum (OMR) attached to one of the microscope eyepieces. After converting the units into millimeters, all carcinoma foci were added up and the result was multiplied by thickness, as though it were a rectangle.

The extent of the prostatic carcinoma was measured under optical microscopy using a millimetered ruler appropriate for use in optical microscopy placed on a glass slide, between this and the lens. The greatest thickness of the carcinoma among all fragments of tumor were obtained in OMR units. After the units were transformed into millimeters, all the carcinoma foci were added up and the result was multiplied by thickness, as though it were a rectangle.

The proportion of carcinoma in each patient was obtained dividing the total area of carcinoma by the total area of fragments in the histological sections.

The nerves were defined as bands at least three cells thick, parallel, with a fascicular configuration. No positive marking of S100 in a fascicle with less than 3 parallel cells or less than 0.0083 millimeters in diameter was considered a nerve, since they could be dendritic cells (fig. 1). The measure was only used as a criterion when there was controversy among the pathologists about the number of parallel cells. This measure, 0.0083 mm, was used as cut point, since it represented the smallest measure that can be

performed by OMR (1 standard unit) under the objective 40x lens and because it corresponds to approximately three parallel cells.

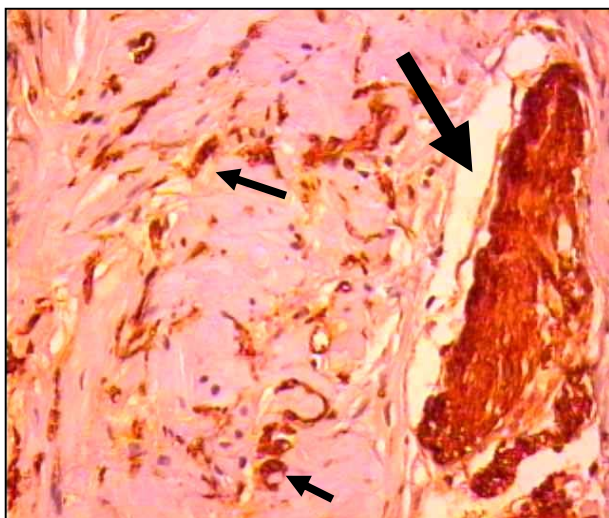


Fig. 1. Nerve (large arrow) S100 – 400x – and S100 staining in structures not considered nerves (small arrows).

Neural invasion was defined as carcinoma glands in the prostate partially or fully surrounding a nerve. Perineural invasion was also considered the presence of glands or groups of atypical epithelial cells inside the nerves. The distinction between invasion and perineural indentation was considered. Indentation was defined as benign or neoplastic glands extrinsic to the perineural space that compress the nerve focally.

For *p53* IHC interpretation, all cases with nuclear marking in the tumor, at any amount and intensity, were initially considered positive for the immunohistochemical reaction, as long as this marking was not interpreted as a technical defect, and the control tests were used to assist in doing so. This type of marking was identified as “*p53*”. Of the cases positive for “*p53*”, information was also collected concerning the amount of positive nuclei among the total number of carcinoma nuclei, in percentage form, evaluated subjectively and identified as “*p53prop*”, and may vary theoretically from 0 (zero)% to 100%, and reaction intensity (“*p53int*”), in a score from 0 (zero) to 3, the value of 3 being

assigned to cases with nuclei stained with a greater intensity and 0 (zero) for cases without marking (or negative). The evaluation of intensity also used the controls as a parameter. In cases where were founded in a same 400x microscopic field 15 or more positive nuclei, at any intensity, the designation of *clustered p53* immunostainig was used (“*p53cl*”).

The comparison between ways of measuring the immunohistochemical positivity for *p53* and the histological findings, serum PSA and age of the patients was performed by obtaining the Spearman correlation coefficient (*Rho*). When two dichotomic nominal variables were compared, coefficient *phi* was also used. The significance test in variables measured on an ordinal scale was performed by measuring the significance of the Spearman *Rho* correlation, which is done with the Student t test. The significance of coefficient *phi* is calculated based on Pearson’s chi-square test. In order to qualify the effect size, tables were used grouping the values obtained in categories that vary from absent to perfect associations (table 1).

Table 1 - Several parameters for effect size interpretation ³⁸

SOURCE	STATISTIC	VALUE	INTERPRETATION
Rea & Parker, 1992	<i>phi</i> or Cramer’s “V”	0.0 —0.1	Negligible Association
		0.1 —0.2	Weak Association
		0.2 —0.4	Moderate Association
		0.4 —0.6	Relatively Strong Association
		0.6 —0.8	Strong Association
		0.8 —1.0	Very Strong Association
Davis, 1971	Correlation Coefficients	≥7	Very Strong Association
		0.5 – 0.69	Substantial Association
		0.3 – 0.49	Moderate Association
		0.1 – 0.29	Low Association
		0.01 – 0.09	Negligible Association
Hinkle, Wiersma & Jurs 1979	Correlation Coefficients	0.9 – 1.0	Very High Correlation
		0.7 – 0.9	High Correlation
		0.5 – 0.7	Moderate Correlation
		0.3 – 0.5	Low Correlation
		0.0 – 0.3	Little if Any Correlation

cont...

...continuation

Hopkins 1997	Correlation	0.9 – 1.0	Almost Perfect Correlation
	Coefficients	0.7 – 0.9	Very Large Correlation
		0.5 – 0.7	Large Correlation
		0.3 – 0.5	Moderate Correlation
		0.3 – 0.1	Small Correlation
		0.0 – 0.1	Insubstantial Correlation

RESULTS

This study evaluated prostate tissue specimens from 101 consecutive procedures of transrectal needle biopsies with prostatic carcinoma of 70 patients. Most patients (85.7%) were over 60 years of age. In 44, 28% of the patients, the serum PSA was between 4.0 and 10.0 ng/ml. Of the 70 patients, 29 (41.4%) had a Gleason score of 7. One case was excluded due to the lack of carcinoma in the histological section on which the immunohistochemistry for *p53* was performed. Tables 2 and 3 describe the clinical and histopathological characteristics of the patients studied.

Table 2 - Descriptive characteristics of patients with prostatic carcinoma (n=69)

Characteristic	Measure of Summary
Age, years	69.1±9.0
Total serum PSA, ng/ml	8.8 (6.4 – 20.1)
Gleason Score	6.6±0,7
Proportion of Carcinoma in total tissue sampled, %	27.3 (6.1 – 51.3)
Measure of the largest length of tumor, mm	5.9 (2,5 – 10.0)

The data are presented as mean± standard deviation or median (interquartile amplitude: P25 – P75). PSA: Prostatic specific antigen.

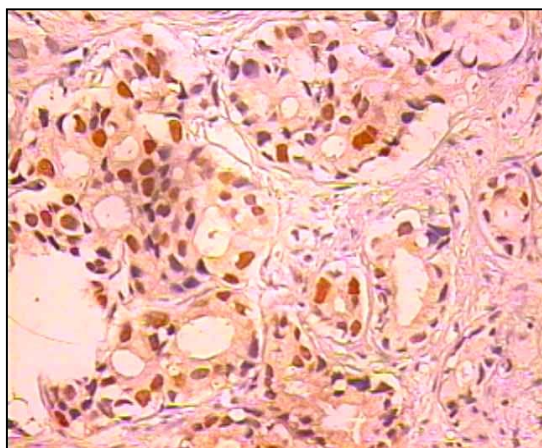


Fig. 2. Clustered immunostaining (15 or more stained nuclei – brown – in a 400x field) for *p53*.

Of the 69 patients studied, 47.8% presented positivity for *p53* and 26.1% were positive for the same marker when the criterion of *clustered* immunostaining was used (fig. 2). When, besides the positivity for *p53*, the proportion of nuclei positive for *p53* was evaluated, the cases varied from no positive nucleus (0%) to 60% of positive nuclei. As to the intensity of positivity, the cases studied obtained values from zero to 3 (fig. 3, 4 and 5). Table 4 shows the descriptive characteristics of the techniques used to measure immunohistochemical positivity for *p53*.

Table 3 - Distribution of patients according to levels of risk for biochemical recurrence in prostatic carcinoma (n=69)³⁹

Level of risk	f	%
Low: PSA \leq 10 and Gleason \leq 6	25	36.2
Intermediate: PSA 10 to 20 or Gleason = 7	35	50.7
High: PSA $>$ 20 or Gleason \geq 8	9	13.1

PSA: Prostatic specific antigen (ng/ml).

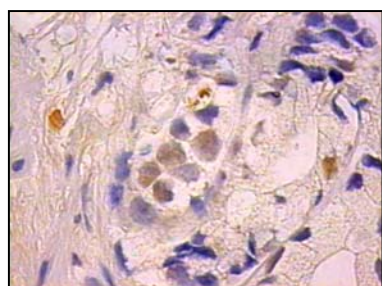


Fig. 3. *p53*+, intensity 1.

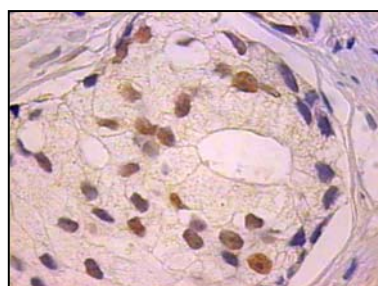


Fig. 4. *p53*+, intensity 2.

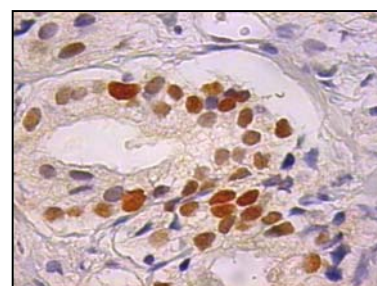


Fig. 5. *p53*+, intensity 3.

Table 4 - Descriptive characteristics of ways to measure immunoreactivity for *p53* (n=69)

Type of IHQ staining for <i>p53</i>	Measure of Summary
<i>Clustered p53</i>	26,1%
<i>p53</i>	47.8%
<i>p53, reaction intensity</i>	0 (0 – 1)
<i>p53, percentage of positive nuclei</i>	0 (0.0 – 7.5)

The data are presented as percentage of positive cases in the sample or median (interquartile range: P25 – P75).

Intensity of positivity for *p53*: 0=negative, 1=positive at weak intensity, 2=positive at intermediate intensity, 3=positive at strong intensity.

Of the 69 cases evaluated, 89.9% had Gleason scores 6 or 7. Table 5 shows the distribution of Gleason scores in patients in whom the expression of *p53* was studied.

Among the ways to determine immunoreactivity for *p53*, *clustered* immunostaining (*p53cl*) presented the highest correlation coefficient values (positive correlation) when compared to the PSA value and the histological characteristics frequently studied as prognostic factors in prostatic carcinoma. These data are presented in table 6. The correlations varied from very weak to moderate.

Table 5 - Distribution of the Gleason scores of patients with carcinoma (n=69)

	<i>Gleason Score</i>				Total
	6	7	8	9	
n	32	30	6	1	69
%	46.4	43.5	8.7	1.4	100

Table 6 - Correlation Coefficient between the methods to measure immunoreactivity for *p53* and clinical and histological findings of patients with prostatic carcinoma

Method	Characteristics					
	Clinical n=68		Histological n=69			
	Age	PSA	OPC	>Tumor Length	PNI (HE)	Gleason
<i>p53prop</i>	0,13 (0.29)	0.18 (0.14)	0.13 (0.30)	0.20 (0.10)	-0.11 (0.35)	0.18 (0.14)
<i>p53int</i>	0,07 (0.54)	0.11 (0.39)	0.15 (0.21)	0.18 (0.13)	-0.17 (0.16)	0.17 (0.15)
<i>p53</i>	0,03 (0.80)	0.18 (0.19)	0.18 (0.15)	0.19 (0.11)	-0.13 (0.27)	0.13 (0.28)
<i>p53cl</i>	0,04 (0.76)	0.23 (0.06)	0.20 (0.09)	0.34 (<0.01)	0.11 (0.37)	0.23 (0.06)

The data are presented as Spearman Rho (p value). PSA: prostatic specific antigen. *p53prop*: proportion(%) of positive cells. *p53int*: intensity of positivity. *p53*: positivity in any pattern. *p53cl*: clustered staining. OPC: objective proportion (%) of carcinoma. > Tumor length: largest length of tumor (mm) in the specimen. PNI: perineural invasion. HE: hematoxylin and eosin method. Gleason: Gleason score.

When the relationship between the presence of perineural invasion (fig.6) and *clustered p53* immunostaining was studied, a tenuous association was found, without statistical significance if perineural invasion was measured by the conventional histological examination (HE). Once perineural invasion was determined with the help of reactivity for S100 protein by immunohistochemistry (fig.7 and 8) there was statistical significance and an increased range of magnitude in coefficient *phi* (0.33; $p < 0.01$). Of the cases of perineural invasion detected by HE, 14.5% presented *clustered p53* immunostaining,

contrasting with 23.2% in cases with perineural invasion detected using the immunohistochemical demonstration of protein S100 (table 7).



Fig. 6. Perineural invasion by carcinoma (HE, 400x).

Table 7 - Coefficient of agreement (*phi*) between *clustered p53* immunostaining and the presence of perineural invasion by a prostatic carcinoma in the HE and immunohistochemistry method for S100 protein. n=69

	n (%)	<i>clustered p53</i>	<i>phi</i>*	p*
Perineural invasion -HE	32 (46.4)	10 (14.5)	0.11	0.36
Perineural invasion -S100	43 (62.3)	16 (23.2)	0.33	<0.01

The values in *clustered p53* column are presented as number of cases with concurrent presence of positivity for *clustered p53* immunostaining and presence of neural invasion (%).

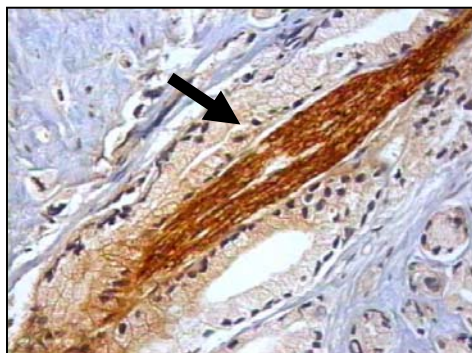


Fig. 7. Perineural invasion
(S100, 400x).

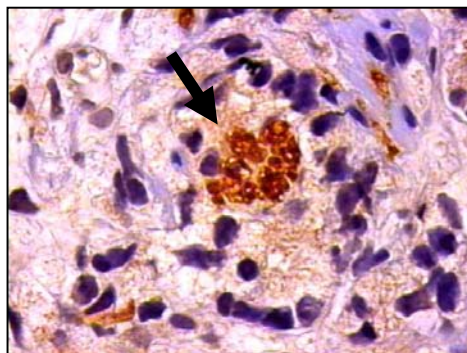


Fig. 8. Perineural invasion
(S100, 1000x).

Of the morphological criteria used to diagnose prostatic carcinoma, statistically significant associations were found between *clustered p53* immunostaining and the presence of mucinous fibroplasia (collagen micronodules) (fig.9) and the presence of more than one prominent nucleolus in a same nucleus (fig. 10) of a carcinoma cell ($p < 0.01$). Data concerning morphological criteria are shown in tables 8 and 9.

Table 8 - Frequency of diagnostic criteria in prostatic carcinomas (n=69) and relationship with *clustered p53* immunostaining, part I

Criteria	Frequency (%)	<i>Clustered p53</i> n (%)	<i>phi</i> *	<i>p</i> *
Nuclear				
Prominent Nucleoli	97.1	18(26.1)	0.10	0.40
More than one (1) Prominent Nucleolus in a Nucleus	55.1	16(23.2)	0.40	<0.01
Increased Nuclear Size (n=67) [†]	73.1	13(19.4)	0.04	0.72
Nuclear Hyperchromasia (n=67) [†]	58.2	12(17.9)	0.15	0.23

cont...

...continuation

Criteria	Frequency (%)	Clustered p53 n (%)	phi *	p*
Cytoplasmatic				
Amphophilia	53.6	11(15.9)	0.09	0.46
Broad Cytoplasm [‡]	28.4	7(10.4)	0.17	0.17
Intraluminal Secretion				
<i>Eosinophilic</i>				
Grumous	91.3	16(23.2)	-0.05	0.67
Concentric	18.8	4(5.8)	0.05	0.67
Without any other specification	8.7	3(4.3)	0.17	0.16
Chrystalloid	31.9	7(10.1)	0.09	0.46
<i>Basophilic</i>				
Mucinous	72.5	15(21.7)	0.14	0.23

The values of *clustered p53* column are presented as number of cases with concurrent presence of clustered p53 immunostaining and the morphological finding – criterion indicated in the first column (%).

[‡] Cases where there was no benign epithelium in the specimen for comparison were excluded.

Phi: measure of association for two dichotomic variables.

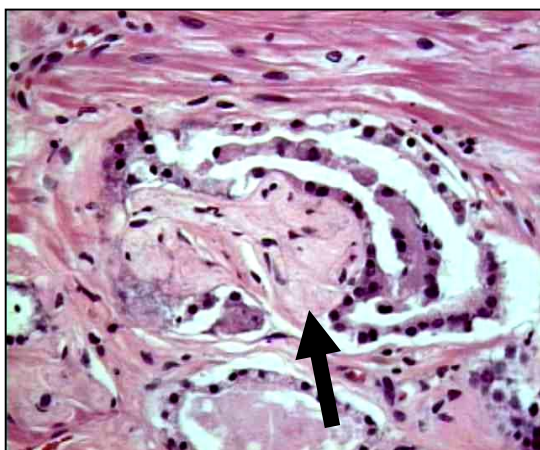


Fig. 9. Mucinous fibroplasia (collagenous micronodules) (H.E. 400x).

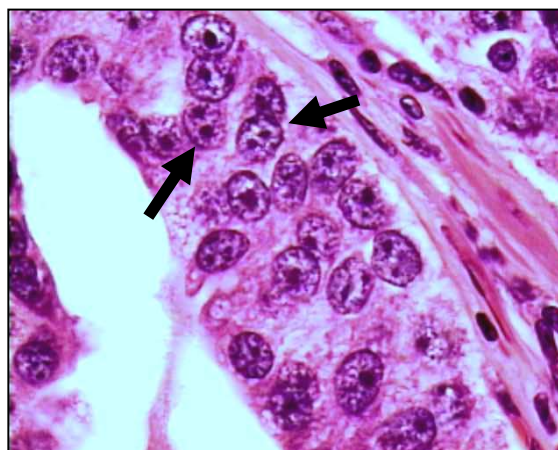


Fig. 10. More than one prominent nucleolus in a nucleus (H.E. 1000x).

Table 9 - Frequency of diagnostic criteria in prostatic carcinoma (n=69) and relationship with *clustered p53* immunostaining, part II

Criteria	Frequency (%)	Clustered p53 n (%)	phi*	p*
Architectural and Stromal ^a				
Glands oriented in axes that are at right angles to each other	88.4	15(83.3)	-0.09	0.43
Small and regular acini between normal acini	84.1	16(23.2)	0.08	0.51
Desmoplasia	21.7	6(8.7)	0.17	0.16
Others				
Figure(s) of mitosis	4.3	2(2.9)	0.20	0.10
Mucinous Fibroplasia [¶]	7.2	4(5.8)	0.34	<0.01
Extraprostatic Extension [‡]	5.8	1(1.4)	0.00	0.96
Glomerulations	18.8	5(27.8)	0.14	0.26
High Grade PIN associated	31.9	8(11.6)	0.16	0.18

The values of *clustered p53* column are presented as number (%) of cases with the concurrent presence of *clustered p53* immunostaining and the morphological finding – criterion – indicated in the first column.

^a Except nerve invasion.

[¶] Collagen micronodules.

[‡] Identified by the finding of infiltration of adipose tissue.

Phi: measure of association for two dichotomic variables.

PIN: prostatic intraepithelial neoplasia.

DISCUSSION

The immunohistochemical determination of *p53* overexpression is associated with a bad prognosis in prostatic carcinomas..

The presence of immunohistochemical overexpression for *p53* is more frequent in carcinomas originating in the peripheral zone than in the transition zone. The latter usually present lower Gleason scores and are less aggressive. ⁴⁰

In our study we found 47.8% positivity for *p53* without other specifications and 26% of *clustered* immunostaining for the same marker. The literature presents frequencies between 6%, in low grade carcinomas⁴¹, and 80%, when any amount of positivity is found in the surgical specimens⁴², and there is clearly great variability depending on the type of material examined and method of measuring immunoreactivity. In the literature we find frequencies between 18% and 66% in biopsies.^{33,36}

The determination of *clustered p53* immunostaining, in the present study, showed itself superior to the other forms of classifying immunoreactivity for the gene product as positive. Even at a magnitude which was not much higher, it was more strongly related to PSA value and to the findings frequently mentioned in the pathological examinations that have predictive value, independent or not, for adverse events in following patients with prostatic carcinoma. There was statistical significance in the correlation with the larger length of the tumor in the samples ($p < 0,01$) and a tendency to statistical significance when the Gleason score ($p = 0.06$) and serum PSA value ($p = 0.06$) were studied.

Considering the results of this study, the lack of change in test costs and because there is no significant increase in the time and difficulty specifically related to this type of measurement when compared to the other methods tested, we do not hesitate to recommend it as one of the methods of choice in biopsies. These findings agree with those of Yang et. al.⁴³ who were pioneers in suggesting this way of performing the immunohistochemical study of the *TP53* mutation in prostate cancer. An explanation for this probably higher specificity to identify the mutation lies in the fact that it is very unlikely that the expression of a protein which in normal circumstances has a short half life, will be detected simultaneously in 15 nuclei inside a same large magnification field (400x) in microscopy.

The preoperative staging of prostatic carcinoma is based on digital rectal examination, serum PSA, histological findings of the biopsy and imaging exams. The digital rectal examination often underestimates the extent of the tumor and the imaging exams add little to the accuracy of preoperative staging. The preoperative interpretation of serum PSA is confounded by nodular hyperplasia of the prostate, and by the degree of tumor differentiation.³⁹ Therefore the serum PSA is not sufficiently adequate to predict final pathological staging in an individual with localized disease. The Gleason score at biopsy is strongly associated with final pathological staging for patients who present extreme scores (scores of 2 to 4 and 8 to 10).²⁸ However, most patients with prostatic carcinoma present Gleason scores 6 and 7, values that are not good predictors of pathological staging. In our sample of 69 patients, 89,9% presented Gleason 6 and 7 scores.

As to *TP53*, there is virtually a consensus in saying that its defective functioning, which may be expressed in the immunohistochemical demonstration of overexpression of protein *p53*, is correlated with the more aggressive profile of the disease. The controversy is whether the determination of mutation by this method has independent predictive power, especially if examined in biopsies, compared to the classical prognostic factors such as, for instance, the Gleason score and value of serum PSA. New studies including also other methods to study the gene are still necessary. The lack of standardization that is universally used for the cutoff point in quantifying positive nuclei which would best represent the presence of mutation or which would indicate the cases with a worse prognosis may be partly responsible for the controversy. In some specific situations, such as those referring to radiation therapy, there appears to be a stronger possibility of clinical use, since cases with the mutation would respond less to the pro-apoptosis effect of this treatment.^{36,44,45}

Perineural invasion by prostatic carcinoma at biopsy, as a predictive variable for tumor staging, has been examined by several studies. However the positive predictive value found is very variable. The frequency of neural invasion varies in the studies from 11 to 38%, therefore it is not surprising that there will be differences between them as to specificity, sensitivity, positive predictive value and negative predictive value.²⁶ Perineural invasion is a diagnostic criterion for prostatic carcinoma and may have predictive value in this disease. The immunohistochemistry technique with S100 allows the detection of smaller diameter invaded nerves, which are difficult to detect in the HE stained slides. The study by Litvin et. al.²⁶, with a sampling of tissue of 70 patients with prostate cancer by needle biopsy, compared the HE method to immunohistochemistry for S100 protein, a more sensitive method to identify nerves.

The present study used the same cases as the Litvin study, except one that was excluded because the prostatic carcinoma disappeared in the histological section that was to be used in the immunohistochemical technique for *p53*. This loss occurred because, when the level of sectioning of the paraffin block was deepened to obtain one more histological section, a tissue specimen (new section) was obtained without neoplasm. This event is not rare in the diagnostic routine of diagnostic surgical pathology.

Litvin, in the 70 patients evaluated, found 31 (44.3%) patients with perineural invasion by carcinoma in HE and 43 (61.4%) with perineural invasion using the immunohistochemical technique for protein S100 ($p < 0.001$). These findings are significant, because they differ considerably from information found in the literature. This statistically significant difference was maintained in the the present study (with 69 patients) that presented similar frequencies for the same findings (respectively 46.4% *versus* 62.3%).

The association of *clustered p53* immunostaining with perineural invasion, when the latter is identified using immunohistochemistry for protein S100, contrasts with the weak association, without statistical significance, when the presence of perineural invasion is determined by a conventional histological examination (HE).

As, according to Litvin's study, the invaded nerves that are detected only in the S100 technique are the smallest, it may be concluded that the invasion of these smaller nerves is responsible for the differences found when we compare it (S100 technique) to HE, as regards *clustered p53* immunostaining, i.e., when there is invasion of small nerves that would usually go unnoticed in conventional histology, there is a greater chance that we are dealing with a case of immunohistochemical positivity for protein *p53*, and a probable mutation of gene *TP53*.

The mechanism that is classically proposed for perineural invasion by carcinoma is that, in the nerve, there is a condition of less tissue pressure^{6,24,46,47}, therefore the carcinomas would have an easier pathway for growth and dissemination. It is possible that in the small nerves carcinoma infiltration is not made easier in the same way by this mechanism.

Some evidence indicates that neural invasion by prostatic carcinoma does not appear to be an effect only of tumor volume and lower pressure on nerves, because small carcinomas may also present neural invasion. Yang et. al.²⁷ reported that the neural component favors neoplasm growth inhibiting apoptosis, which would make it easier for the carcinoma to be disseminated in nerves, even in carcinomas considered small.

Since normal *TP53* has multiple known functions to protect tumor development and their progression, it is possible that subclones in which there is a mutation of this in prostatic carcinoma will be favored for the development of other mutations, including one (some) that favors (favor) a greater potential for neoplasm infiltration, allowing neural invasion by mechanism(s) different from the easy way provided by a lower pressure environment present in these structures. Furthermore, one of the apoptosis inhibition mechanisms in tumors is *TP53* dysfunction.

These findings stimulate the study of perineural invasion as a prognostic factor due to the high frequency of this event in the cases studied both with conventional histology (HE) and in cases examined with protein S100, where the frequency is even higher and smaller-sized nerves are found. They also reinforce the incentive to research other factors related directly to tumor invasiveness, such as intercellular adhesion molecules and molecules related to stromal digestion, to account for a possible specific mechanism responsible for small nerve invasion, as suggested by the higher frequency of immunohistochemical overexpression of *p53* in lesions with this finding.

Other statistically significant associations with *clustered p53* immunostaining were the presence of more than one prominent nucleoli in a same nucleus of a carcinoma cell and collagen micronodules (mucinous fibroplasia).

More than one prominent nucleolus per nucleus was a finding identified in 55.1% of our sample. In the study by Varma et. al., who studied diagnostic morphological criteria in prostatic carcinomas, this finding appeared in 64% of the cases. Since nucleoli are related

to protein synthesis⁴⁸, cases with the mutation of a gene (*TP53*) that suppresses tumors by mechanisms discussed previously would present increased protein synthesis activity.

Collagen micronodules are classically defined as a reaction of the prostatic stroma to the extravasation of mucous secretion from the malignant acini.^{16,49} This finding (collagen micronodules) is infrequent in prostatic carcinoma (0.1-2%)^{19-22,49}, and is considered pathognomonic for the tumor, since the benign prostate tissue in the series studied^{19,21,49,50}, never presented this finding. In our study a greater frequency of this finding was identified (7.2%). The reason for the greater frequency and the association found lacks a theoretical model to explain it, and new studies are needed to confirm and provide a further explanation for this.

CONCLUSIONS

Morphological findings associated with the overexpression of *p53*: collagen micronodules and more than one prominent nucleolus in the same nucleus of prostatic carcinoma cell, in biopsies, are promising histological variables for studies to determine the prognosis of this disease.

Perineural invasion, only when detected with the help of the immunohistochemical technique for protein S100, is positively associated with the immunohistochemical determination of *p53* overexpression.

Perineural invasion detected by S100, especially when it is small, constitutes an interesting experimental model to study the biological and clinical characteristics of prostatic tumors.

The measurement of positivity for *p53* with *clustered* pattern presented higher values of correlation measures and association with the value of serum PSA, amount of tumor in the total tissue sampled, measure of the largest length of tumor in the samples, Gleason score and presence of perineural invasion in prostatic carcinomas diagnosed at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, compared to other modalities tested in material from a transrectal needle biopsy.

REFERENCES

1. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 2000;21(6):167-223.
2. Passaglia LMP. Mutação, mecanismos de reparo do DNA e recombinação. In: Zaha A. ed. *Biologia Molecular Básica*. Porto Alegre, Mercado Aberto; 1996. p. 116-134.
3. Liu Y, Kulesz-Martin M. p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding. *Carcinogenesis* 2001;22(6):851-860.
4. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. *Robbins & Cotran Patologia. Bases patológicas das doenças*. Rio de Janeiro, Elsevier; 2005. p. 300-333.
5. Leibovich BC, Cheng L, Weaver AL, Myers RP, Bostwick DG. Outcome prediction with p53 immunostaining after radical prostatectomy in patients with locally advanced prostate cancer. *J Urol* 2000;163(6):1756-1760.

6. Majno G, Joris I. Antitumor defenses. In: Majno G, Joris I. Cells, tissues, and disease : principles of general pathology. Cambridge, Mass., Blackwell Science; 1996. p. 885-895.
7. Stackhouse GB, Sesterhenn IA, Bauer JJ, Mostofi FK, Connelly RR, Srivastava SK, et. al. p53 and bcl-2 immunohistochemistry in pretreatment prostate needle biopsies to predict recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 1999;162(6):2040-2045.
8. Shurbaji MS, Kalbfleisch JH, Thurmond TS. Immunohistochemical detection of p53 protein as a prognostic indicator in prostate cancer. *Hum Pathol* 1995;26(1):106-109.
9. Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi KF, McLeod DG, Srivastava S, Moul JW. p53 nuclear protein expression is an independent prognostic marker in clinically localized prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 1995;1(11):1295-1300.
10. Borre M, Stausbol-Gron B, Overgaard J. p53 accumulation associated with bcl-2, the proliferation marker MIB-1 and survival in patients with prostate cancer subjected to watchful waiting. *J Urol* 2000;164(3 Pt 1):716-721.
11. Eastham JA, Stapleton AM, Gousse AE, Timme TL, Yang G, Slawin KM, et. al. Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1995;1(10):1111-1118.

12. Quinn DI, Henshall SM, Head DR, Golovsky D, Wilson JD, Brenner PC, et. al. Prognostic significance of p53 nuclear accumulation in localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Cancer Res* 2000;60(6):1585-1594.
13. Epstein JI, Algaba F, Allsbrook Jr. WC, Bastacky, S, Boccon-Gibod L, De Marzo AM, Egevad L, et. al. Tumors of the prostate. In: Eble JN, ed. *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Oxford, Oxford University Press; 2004. p. 159-192.
14. Bostwick DG. Neoplasms of the prostate. In: Bostwick DG, Eble JN eds. *Urologic surgical pathology*. St. Louis, Mosby-Year Book; 1997. p. 343-442.
15. Young RH, Srigley JR, Amin MB, Ulbright TM, Cubilla AL: Carcinoma of the prostate gland. In: Young RH, ed. *Tumors of the prostate gland, seminal vesicles, male urethra, and penis*. Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology . American Registry of Pathology Armed Forces Institute of Pathology; 2000. p. 111-199.
16. Epstein JI, Yang XJ. Diagnosis of limited adenocarcinoma of the prostate. In: Epstein JI, Yang XJ, eds. *Prostate biopsy interpretation*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 64-91.
17. Bostwick DG, Dundore PA. Adenocarcinoma. In: *Biopsy pathology of the prostate*. Bostwick DG, Dundore PA, eds. London ; New York, Chapman & Hall Medical; 1997. p. 107-140.

18. Coelho GP, Litvin IE, Guerreiro V, Almanza AA, Edelweiss MIA. Prevalência dos critérios diagnósticos em carcinoma prostático: um estudo de base populacional. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003;39(Suplemento Científico do XXIV Congresso Brasileiro de Patologia):101.
19. Baisden BL, Kahane H, Epstein JI. Perineural invasion, mucinous fibroplasia, and glomerulations: diagnostic features of limited cancer on prostate needle biopsy. *Am J Surg Pathol* 1999;23(8):918-924.
20. Epstein JI. Diagnosis and reporting of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Mod Pathol* 2004;17(3):307-315.
21. Varma M, Lee MW, Tamboli P, Zarbo RJ, Jimenez RE, Salles PG, et. al. Morphologic criteria for the diagnosis of prostatic adenocarcinoma in needle biopsy specimens. A study of 250 consecutive cases in a routine surgical pathology practice. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126(5):554-561.
22. Arangelovich V, Tretiakova M, SenGupta E, Krausz T, Yang XJ. Pathogenesis and significance of collagenous micronodules of the prostate. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003;11(1):15-19.
23. Epstein JI. Diagnostic criteria of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Hum Pathol* 1995;26(2):223-229.
24. Villers A, McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. The role of perineural space invasion in the local spread of prostatic adenocarcinoma. *J Urol* 1989;142(3):763-768.

25. Mc Neal JE. Anatomy of the prostate: implications for disease. In: Bostwick DG, ed. Pathology of the prostate. New York, Churchill Livingstone; 1990. p. 1-14.
26. Litvin IE. Invasão de nervos pelo carcinoma da próstata em biópsias transretais. [Dissertação de Mestrado] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre; 2004.
27. Yang G, Wheeler TM, Kattan MW, Scardino PT, Thompson TC. Perineural invasion of prostate carcinoma cells is associated with reduced apoptotic index. *Cancer* 1996;78(6):1267-1271.
28. Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond ME, Amin MB, Cohen M, Crawford D, et al. Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):995-1000.
29. Egan AJ, Bostwick DG. Prediction of extraprostatic extension of prostate cancer based on needle biopsy findings: perineural invasion lacks significance on multivariate analysis. *Am J Surg Pathol* 1997;21(12):1496-1500.
30. O'Malley KJ, Pound CR, Walsh PC, Epstein JI, Partin AW. Influence of biopsy perineural invasion on long-term biochemical disease-free survival after radical prostatectomy. *Urology* 2002;59(1):85-90.
31. de la Taille A, Katz A, Bagiella E, Olsson CA, O'Toole KM, Rubin MA. Perineural invasion on prostate needle biopsy: an independent predictor of final pathologic stage. *Urology* 1999;54(6):1039-1043.

32. de la Taille A, Rubin MA, Bagiella E, Olsson CA, Buttyan R, Burchardt T, et. al. Can perineural invasion on prostate needle biopsy predict prostate specific antigen recurrence after radical prostatectomy? *J Urol* 1999;162(1):103-106.
33. Oxley JD, Winkler MH, Parry K, Brewster S, Abbott C, Gillatt DA. p53 and bcl-2 immunohistochemistry in preoperative biopsies as predictors of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *BJU Int* 2002;89(1):27-32.
34. Karaburun Paker S, Kilicarslan B, Ciftcioglu AM, Oztekin S, Sargin FC, Erdogru T, et. al. Relationship between apoptosis regulator proteins (bcl-2 and p53) and Gleason score in prostate cancer. *Pathol Oncol Res* 2001;7(3):209-212.
35. Brewster SF, Oxley JD, Trivella M, Abbott CD, Gillatt DA. Preoperative p53, bcl-2, CD44 and E-cadherin immunohistochemistry as predictors of biochemical relapse after radical prostatectomy. *J Urol* 1999;161(4):1238-1243.
36. Grignon DJ, Caplan R, Sarkar FH, Lawton CA, Hammond EH, Pilepich MV, et. al. p53 status and prognosis of locally advanced prostatic adenocarcinoma: a study based on RTOG 8610. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(2):158-165.
37. Moul JW, Bettencourt MC, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG, Srivastava S, et. al. Protein expression of p53, bcl-2, and KI-67 (MIB-1) as prognostic biomarkers in patients with surgically treated, clinically localized prostate cancer. *Surgery* 1996;120(2):159-166; discussion 166-157.

38. Kotrlík JW, Williams HA. The Incorporation of Effect Size in Information Technology, Learning, and Performance Research. *Information Technology, Learning, and Performance Journal* 2003;21(1):1-7.
39. Partin AW, Yoo J, Carter HB, Pearson JD, Chan DW, Epstein JI, et. al. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol* 1993;150(1):110-114.
40. Erbersdobler A, Fritz H, Schnoger S, Graefen M, Hammerer P, Huland H, et. al. Tumour grade, proliferation, apoptosis, microvessel density, p53, and bcl-2 in prostate cancers: differences between tumours located in the transition zone and in the peripheral zone. *Eur Urol* 2002;41(1):40-46.
41. Haussler O, Epstein JI, Amin MB, Heitz PU, Hailemariam S. Cell proliferation, apoptosis, oncogene, and tumor suppressor gene status in adenosis with comparison to benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, and cancer. *Hum Pathol* 1999;30(9):1077-1086.
42. Stricker HJ, Jay JK, Linden MD, Tamboli P, Amin MB. Determining prognosis of clinically localized prostate cancer by immunohistochemical detection of mutant p53. *Urology* 1996;47(3):366-369.
43. Yang G, Stapleton AM, Wheeler TM, Truong LD, Timme TL, Scardino PT, et. al. Clustered p53 immunostaining: a novel pattern associated with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 1996;2(2):399-401.

44. Ritter MA, Gilchrist KW, Voytovich M, Chappell RJ, Verhoven BM. The role of p53 in radiation therapy outcomes for favorable-to-intermediate-risk prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53(3):574-580.
45. Scherr DS, Vaughan ED, Jr., Wei J, Chung M, Felsen D, Allbright R, et. al. BCL-2 and p53 expression in clinically localized prostate cancer predicts response to external beam radiotherapy. *J Urol* 1999;162(1):12-16; discussion 16-17.
46. Rodin AE, Larson DL, Roberts DK. Nature of the perineural space invaded by prostatic carcinoma. *Cancer* 1967;20(10):1772-1779.
47. Hassan MO, Maksem J. The prostatic perineural space and its relation to tumor spread: an ultrastructural study. *Am J Surg Pathol* 1980;4(2):143-148.
48. Junqueira LC. O núcleo celular. In: Junqueira LC, Carneiro J, eds. *Histologia Básica*. 10th ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan; 2004. p. 52-66.
49. Bostwick DG, Wollan P, Adlakha K. Collagenous micronodules in prostate cancer. A specific but infrequent diagnostic finding. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119(5):444-447.
50. Thorson P, Vollmer RT, Arcangeli C, Keetch DW, Humphrey PA. Minimal carcinoma in prostate needle biopsy specimens: diagnostic features and radical prostatectomy follow-up. *Mod Pathol* 1998;11(6):543-551.